

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Valoración actual de las pruebas serológicas en el criterio de
curabilidad de la sífilis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Luis Rivero Gazol

DIRECTOR:

José Bravo Oliva

Madrid, 2015

José Luis Rivero Gazol



53-277428-5

TP
1983
001

VALORACION ACTUAL DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EN EL CRITERIO
DE CURABILIDAD DE LA SIFILIS

Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 61/83

© José Luis Rivero Gazol
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-5401-1983

Autor : JOSE RIVERO GAZOL

**VALORACION ACTUAL DE LAS PRUEBAS
SEROLOGICAS EN EL CRITERIO DE
CURABILIDAD DE LA SIFILIS**

Director : JOSE BRAVO OLIVA .

Catedrático de microbiología y parasitología
de la facultad de Medicina de la Universidad
Complutense. MADRID .

ACULTAD DE MEDICINA

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA
Y PARASITOLOGIA

CATEDRATICO: D. JOSE BRAVO OLIVA

MADRID

CIUDAD UNIVERSITARIA

PABELLON II

TELEF. 243 92 53

D JOSE BRAVO OLIVA. CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que el trabajo titulado+ " VALORACION _
ACTUAL DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EN --
EL CRITERIO DE CURABILIDAD DE LA SIFILIS"
ha sido realizado bajo mi dirección des-
de junio de 1979, por D. José Luis Rive-
ro Gazol, y que reúne a mi juicio las --
condiciones necesarias para ser presenta-
do como tesis doctoral en la Facultad de
Medicina de la Universidad Complutense -
de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente
certificado en Madrid a treinta de junio de
mil novecientos ochenta y uno.

EL CATEDRATICO



Fdo: D. Jose Bravo Oliva

A G R A D E C I M I E N T O

Al Profesor Dr. D. José Bravo Oliva, sin cuyo estímulo y apoyo no hubiese sido posible este trabajo.

DEDICATORIA

A Elisa mi compañera

I

I N D I C E

INTRODUCCION.....	Pag. -- 1
Cap. I - RESEÑA HISTORICA.....	" - - 5
" II - MORFOLOGIA Y COMPOSICION QUIMICA	
DEL TREPONEMA.....	" - 18
Formas típicas.....	" - 18
Formas atípicas.....	" - 36
Fisiología.....	" - 33
Metabolismo lipídico.....	" - 43
Reproducción.....	" - 45
Cultivo.....	" - 45
Cultivo in vivo.....	" - 47
Cap.III - ANTIGENOS DEL TREPONEMA	" - 49
Análisis biológico de los Antige-	
nos.....	" - 50
Cap.IV - TAXONOMIA.....	" - 59
Los Espiroquetas.....	" - 60
Clave de las especies del género.	
Treponema.....	" - 62

II

Cap. V- - MATERIAL Y METODO.....	Pag.- - 66
Técnica V.D.R.L.....	" - - 69
Prueba de la Inmunofluorescen-	
cia indirecta F.T.A. Abs.....	" - - 71
Test de Scotte Logan.....	" - - 85
" de inmovilización de	
Nelson.....	" - - 88
Transformación blástica del	
Linfocito.....	" - 102
Cap. VI - - RESULTADOS.....	" - 112
" VII - CRITERIOS DE CURACION.....	" - 137
" VIII - DISCUSION.....	" - 149
" IX - - CONCLUSIONES.....	" - 160
BIBLIOGRAFIA.....	" - 165

III

ICONOGRAFIA

Fig. - 1	Pag. - 20
" - 2	" - 20
Fot. - 1	" - 72
" - 2	" - 72
" - 3	" - 73
" - 4	" - 73
Graf. 1	" - 81
Fot. - 5	" - 83
" - 6	" - 83
" - 7	" - 87
" - 8	" - 87
" - 9	" - 99
" -10	" - 99
" -11	" -100
" -12	" -100
" -13	" -101
" -14	" -101
Graf. 2	" -108

IV

Fot. - 15	Pag. - 111
" - 16	" - 111
Quadro 1	" - 113
" - 2	" - 114
" - 3	" - 115
" - 4	" - 116
" - 5	" - 117
Graf. - 3	" - 120
" - 4	" - 121
" - 5	" - 122
" - 6	" - 123
" - 7	" - 124
" - 8 ,.....	" - 125
" - 9	" - 139
" -10	" - 146

FIN

INTRODUCCION

Es indudable la creciente incidencia actual de la sífilis, y son sobradamente conocidas las razones socioeconómicas causantes de este alza desmedida. Por esto, es de la mayor importancia sanitaria el control y la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, con pruebas de laboratorio seguras, que nos indiquen en un determinado momento cuando un individuo se encuentra padeciendo una enfermedad activa, (bien en el período sintomático o en el de latencia), y cuando una seropositividad sólo indica la inercia inmunológica de una sífilis padecida y curada. Afortunadamente contamos con técnicas de diagnóstico más sofisticadas y delicadas que para cualquier otra enfermedad, aunque es sabido, que las pruebas serológicas que se prescriben de manera rutinaria, rara vez conducen al esclarecimiento de la situación, y es frecuente encontrar enfermos, que ante la reiterada positividad de unos test de inmunofluorescencia o, -

de inmovilización, han recibido repetidos ciclos de tratamiento innecesarios, terminando por crearles situaciones anímicas, de posibles portadores de una enfermedad a la que la sociedad atribuye taras congénitas, con la carga que éste estado psíquico conlleva.

Aislar y cultivar "in vitro" el germen causal sería la mejor ayuda que podíamos prestar al clínico para la correcta interpretación de la curación, pero desgraciadamente aún no se ha conseguido esta meta.

La combinación más racional de todos los test, tanto específicos como inespecíficos pueden contribuir más que cualquier otra exploración a la clarificación diagnóstica.

La adopción de los procedimientos inmunofluorescentes monoespecíficos cuantitativos, unidos a los ya clásicos de "Venereal Disease Research Laboratory", (V.D.R.L.), "Treponemal Pallidum Immobilization" (T.P.I.), y "Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption" (F.T.A. ABS) nos dan una correcta información de la evolución que siguen la inmunoglobinas en el proceso patológico luético. De igual forma, el creciente conocimiento de la participación de la inmunidad celular en la infección sifilítica, descubre una nueva vertiente de investigación, iniciada

con éxito con la aplicación de la transformación blástica de los linfocitos y deja vislumbrar la posibilidad de la consecución final de una vacuna.

Nuestro trabajo va a consistir en tratar de dilucidar con la ayuda exclusiva del laboratorio, cuando hay enfermedad activa o cuando se trata solamente de anticuerpos residuales de un proceso ya curado; cuando un resultado puede ser falsamente positivo, y que valor podemos dar a cada dato o conjunto de datos.

Comenzaremos nuestra exposición con una reseña histórica. Después haremos una descripción taxonómica, morfológica y antigénica del agente causal, para mejor comprensión posterior de los mecanismos íntimos que rigen cada reacción y sus resultados. Proseguiremos introduciéndonos en la intimidad de las reacciones, para familiarizarnos con sus diferencias y comprender sus causas determinantes y sobre todo para poder explicar el porqué entre la multitud de pruebas existentes se ha escogido un pequeño número de ellas. A continuación hacemos la comparación de una serie de datos obtenidos en distintos períodos de la enfermedad. Para la obtención de estos datos, hemos escogido una serie de enfermos sífilíticos de la Escuela Central de Serología que han sido controlados

exhaustivamente por nosotros durante estos 10 últimos - años. Hemos seguido la evolución de su estado inmunológico mediante las pruebas humorales y celulares en los momentos más significativos de la enfermedad, es decir, en el de contacto, en el de iniciación de la enfermedad, durante el transcurso de ella y cuando la curación es ya - presumible.

Con la evaluación de los datos obtenidos hemos elaborado finalmente unas conclusiones que nos permitirán - una valoración diagnóstica mucho más aproximada del momento en que se encuentra la infección treponémica.

RESEÑA HISTÓRICA

El apelativo de sífilis deriva de un poema titulado "SIPHILIS SUE DE MORBO GALLICO" que escribió el médico - JERONIMO FRANCASTORIUS en 1530. El protagonista del poema era Sífilo, pastor que habiendo ofendido a Apolo, fué castigado por el dios con la enfermedad.

El morbo fué conocido por algunos pueblos como "GALLICO CELTICO" debido a que su propagación la atribuían a los soldados franceses; estos sin embargo le llamaban "MAL NAPOLITANO", los holandeses "MAL O VIRUELA ESPAÑOLA", los rusos "MAL POLACO", los turcos "MAL CRISTIANO", los italianos "MAL FRANCES", etc.

En cuanto al origen de la enfermedad, hay cierto confucionismo: mientras algunos historiadores creen que provenía de Asia y se propagó por Europa durante la invasión de los mongoles en el siglo XIII, otros opinan que el origen es sudamericano, más exactamente de la Selva --

Peruana, cuyos habitantes según la leyenda, la habian -
contraído de las llamas, SOUBIRAN Y KEARNEY (1963).

JEANSELME (1947) llega a la misma conclusión, des--
pués de una exhaustiva recopilación de los textos médi--
cos y religiosos anteriores al siglo XV, al no encontrar
datos decisivos de la existencia de sífilis en el Viejo -
Mundo, antes del regreso de Cristobal Colón de su viaje
de América.

KAIL y FROE (1958) discrepan de las teorías anterio
res, pues al estudiar el cráneo descubierto por SETON y
LLOID en Africa, perteneciente a un individuo que vivió
en el primer milenio antes de J.C., encuentran lesiones
de periostitis gomosas, atribuibles a la sífilis.

CAPPER y WONG (1960) afirman que en la literatura -
de la antigua China, también se encuentran descritas le-
siones que por su semejanza, no hay duda de que pertene-
cen a esta enfermedad.

GUTHER (1968) piensa, que la peste de Moab descrita
en la Biblia, puede corresponder a la enfermedad lúética,
lo mismo que las lesiones padecidas por Job, que equival
drían a un estado secundario.

Personalmente creemos, que resulta extraordinaria--

mente difícil, deducir de libros tan antiguos, y que literalmente son una mezcla religiosa, política y médica, - si se trata de la enfermedad sifilítica o por el contrario de alguna otra afección que produce alteraciones similares. Lo que no hay duda, es que habia sífilis en Europa y Asia antes del descubrimiento de América. Pero se trataba de una afección rara, poco virulenta, no comparable por su extensión a la epidemia sifilítica del siglo XVI.

La lues comenzó a ser descrita con gran precisión - por los médicos e historiadores del siglo XVI, como lo - demuestran los textos de RUIZ DIAZ DE LA ISLA en su tratado de "Mal Serpentino", en donde se encuentran reflejadas las lesiones sifilíticas que vulgarmente son llamadas "bubas". Igualmente BARTOLOME DE LAS CASAS en la Historia General de las Indias nos lo confirma con sus finas descripciones.

Posteriormente la lues, fue cobrando en Europa cada vez mayor extensión y virulencia constituyendo un problema sanitario de difícil solución.

Supuso un gran avance para su estudio, cuando el - biólogo SCHAUDINN y el sifiliógrafo HOFFMANN en 1905 lo-

graron demostrar la presencia de un finísimo espirilo, - en las lesiones primarias y ganglionares de los enfermos sífilíticos. Posteriormente fue confirmada la veracidad de este importantísimo descubrimiento por numerosas personalidades en la materia como METSCHNIKOFF, ROUX, NOGUSHI, etc.

Tampoco tenemos que dejar en el olvido a algunos - investigadores que aunque no llegaron al éxito final si supieron vislumbrar de una manera empírica este germen: LUTSEARTEN (1894), BORDET y GENGOU (1904), e incluso SIEGEL (1904) que había descrito un protozooario, el Cyto---rrhyctes Luis, aunque después se demostró que era un germen saprofita presente en la mayor parte de las lesiones sífilíticas.

Con el descubrimiento del germen, no sólo no se había terminado el problema del diagnóstico de esta afección, sino también comenzaban nuevos interrogantes. Pronto se puso de manifiesto que, el agente causal no se encuentra en lugares fácilmente accesibles nada más que al comienzo de la enfermedad, es decir, que se encuentra en órganos internos, y su visualización directa supone inconvenientes difíciles de superar, por lo que tenemos - que recurrir a otros procedimientos indirectos, que nos

presupone que aunque no lo veamos ha sido capaz de producir un anticuerpo.

El inicio de la serología de la sífilis comienza - cuando WASSERMANN, NEISSER y BRUCK (1906) consiguieron - poner de manifiesto un anticuerpo contra esta enfermedad al aplicar la técnica de desviación del complemento al - serodiagnóstico de la lues, empleando como antígeno extracto acuoso de hígado de feto heredosifilítico infectado con treponemas. Muy pronto se descubrió, sin embargo, que el anticuerpo específico podía demostrarse usando como antígeno hígado sano. MARIE y LEVADITI (1907). LANDSTEINER (1907) reemplaza el extracto acuoso por el alcohólico de lípidos del hígado, localizando la actividad antigenica en la fracción lipoidea.

Al factor serico o anticuerpo que floculaba y fijaba el complemento en presencia de los extractos alcohólicos lipídicos se le llamó "REAGINA", para no prejuzgar - la naturaleza de la reacción y poder diferenciarlo de los anticuerpos genuinos. MICHAELIS (1907), PORGES y MEIER - (1908), JACOBSTAHL (1910), etc.

La práctica de la reacción de fijación del complemento establecida por Wassermann tuvo que sustituirse ante la dificultad de conseguir animales de laboratorio, du--

rante la Guerra Europea de 1914, por técnicas que empleaban como antígenos, suspensiones vegetales y cuya visualización se manifestaba por floculación, como por ejemplo la reacción de Meinicke, o la floculación producida de la mezcla colessterina-lecitina, como las reacciones de Kahn, Citochol, etc.

MARY PARGBORN en 1942 consiguió la obtención de la sustancia lipóidea pura, de características definidas, responsable de todas las reacciones anteriores, conocida desde entonces con el nombre de "cardiolipina" por ser el corazón la fuente de su origen.

FOURE y MORELEC COULON (1959) consiguieron determinar la composición química de la cardiolipina y el químico DE HASS en 1965 logra la síntesis completa de la misma. Este antígeno sintético resultó ser muy superior a los antígenos extraídos de órganos de animales.

Estudiando la composición de los antígenos que se empleaban en las pruebas de floculación, se puso de manifiesto que en todos ellos se encontraban presentes, el cardiolípido, la lecitina o el colesterol, ya por separado, ya dos de ellos o incluso los tres en diferentes proporciones.

HARRIS (1946-48) en el "Veneral Disease Laboratory Research" del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, después minuciosos análisis y observaciones llegó al convencimiento de que los mejores resultados para la puesta en evidencia de la reagina, se obtenían cuando se empleaban antígenos en cuya composición participaban en determinadas proporciones las tres sustancias anteriormente enumeradas. También descubrió, una metódica de floculación y microfloculación que empleaba este antígeno, logrando alcanzar con ella una gran sensibilidad y reproductibilidad. Esta técnica por su sencillez y exactitud fue adoptada como técnica patrón por la O.M.S. y se la conoce desde entonces por las siglas V.D.R.L. en honor del centro donde se llevó a cabo la investigación.

Con la reacción de V.D.R.L. se contaba ya con una excelente técnica de floculación para detectar la reagina, pero no por ello se detuvo la investigación para encontrar nuevos métodos que resaltasen ciertas características o se añadiesen otras. Siguiendo este principio se ha logrado, aunque no superar la sensibilidad de la reacción, al menos trabajar en condiciones menos complicadas, bien logrando suprimir o acortar algunos tiempos de la reacción o modificar la esencia de la técnica, ha

biendose llegado a conseguir antígenos que detecten la -
reagina sin inactivar el suero e incluso en sangre dese-
cada o en plasma. Las sustancias incorporadas para lo---
grar estos fines son muy variadas, como el carbón, la eo
sina, el latex, etc. PORTNOY (1962), BROWN (1964), TIO -
(1970).

Paralelamente a estas reacciones inespecíficas apa-
recen los esbozos de otras clases de reacciones, inmuni-
tariamente específicas siendo uno de los pioneros TURNER
que en 1931 demostró que la mezcla de una suspensión de
treponemas virulentos de la cepa Nichols, con suero de -
sifilítico, mantenida así durante unas horas, no era ca-
paz de producir infección en el testículo de conejo, -
mientras que sí se producía la infección si la suspen---
sión de treponemas se mezclaba con el suero de un indivi
duo normal. Estos anticuerpos seroprotectores de Turner
fueron individualizados por NELSON en 1947 dándoles el -
nombre de inmovilisin, sistematizando dos años más tar
de, junto con MAYER la reacción capaz de poner en eviden
cia la existencia de esos anticuerpos específicos (TREPO
NEMA PALLIDUM INMOVILIZATION) o T.P.I. Desde entonces se
intenta encontrar una técnica de fácil realización y con
la especificidad y sensibilidad suficiente que sea capaz

de sustituir a esta reacción tan complicada, pero hasta la actualidad no se ha conseguido.

En 1965 RATHLEY aplica por primera vez la hemaglutinación en el diagnóstico de la sífilis, TOMIZAWA (1966-1969) la desarrolla y perfecciona, eliminando las reacciones cruzadas inespecíficas mediante la absorción de los sueros. Esta reacción de nombre TPHA (TREPONEMA PALLIDUM HAEMAGLUTINATION ASSAY) es una hemaglutinación pasiva basada en la aglutinación de los hematíes de conejo tanizados y sensibilizados con antígeno treponémico, procedente del ultrasonado de los treponemas pallidum extraídos del testículo de conejo.

La aparición de la inmunofluorescencia iniciada por MARRACK en el año 1934 y el mejoramiento y perfeccionamiento de la técnica por COONS en 1942 y 1954 permiten que DEACON (1957) pueda aplicar por primera vez dicha técnica al diagnóstico de la sífilis. HUNTER y MAYER e incluso el mismo DEACON en 1964 proponen la inmunofluorescencia indirecta con absorción de los anticuerpos inespecíficos: FTA (FLUORENSCENT TREPONEMAL ANTIBODY) y FTA-Abs (FLUORENSCENT TREPONEMAL ANTIBODY ABSORTION).

Las técnicas inmunofluorescentes se hacen más selec

tivas al incorporar la metódica de inmunodifusión radial de MANCINI, con las modificaciones propuestas por AUGER (1965) que permiten realizar rutinariamente investigaciones cuantitativas de IgA, IgG e IgM en gran número de pacientes.

Se establecen los valores de inmunoglobulinas en los diferentes estadios de la sífilis por BECKER, WRAPP, HEITMAN, LAUREN, etc. en 1970; valores que concuerdan con los apuntados por D'ELMAUTY en 1961 con los métodos clásicos.

KIRALY, BACKHAUSZ, JOBBAGY (1968) emplean antisueros específicos de monoglobulinas IgA, e IgM marcadas con fluoresceína para la realización de la inmunofluorescencia indirecta absorbida.

SCOTTI Y LOGAN en 1968 logran sentar las bases que permiten diagnosticar la sífilis congénita en el recién nacido, en ausencia de signos clínicos, empleando un conjugado sérico anti IgM fluoresceinado.

No solamente se ha logrado marcar las antigamma-globulinas humanas con materiales fluorescentes sino también se ha conseguido incorporar los compuestos más diversos para la señalización del conjugado como son: las en-

zimas, isotopos, etc. con muy buenos resultados (AVRA--
MEAS 1966); SEPETJIAN, THIVOLET, LEUN-TACK, MONIER -
(1973) y por nosotros en la Escuela Central de Serolo--
gía, en 1975.

Hasta aquí hemos examinado los principales jalones por los que han pasado las pruebas que ponen de mani---fiesto la inmunidad humoral, pero tenemos que tener en cuenta que junto a esas pruebas que son conocidas desde antiguo por su fácil demostración, existen otras no menos importantes, que estudian la respuesta mediante células inmunizadas, "LA INMUNIDAD CELULAR" de difícil de demostración, debiendo recurrirse a medios indirectos como son: la desaparición del antígeno o los cambios estructurales que sufren las células. Esta respuesta es específica porque sólo se presenta cuando el agente causal entra en contacto con el organismo.

Debido a los éxitos que se alcanzaron con las cuti rreacciones, sobre todo con la tuberculina, muchos sifi lógrafos se animaron a aplicar esta metódica como NEIS-SER (1911), aplicando como material de inyección extrac tos de órganos sifilíticos; NOGUCHI con treponemas cul tivados; CSONKA (1950) con antígeno de lesiones de cone jo sifilítico; HURIEZ (1961), LAIRD y THORBURN (1966) -

con suspensiones de treponemas muertos. Los resultados -
conseguidos con estas cutirreacciones no han sido muy ha
lagüeños hasta la fecha pero es una posibilidad que no -
se ha abandonado.

LAZZARO y LANZA (1968) realizaron por primera vez -
unas observaciones derivadas de que los linfocitos circu
lantes procedentes de sifilíticos, se transformaban en -
células blásticas en porcentaje altamente significativo,
cuando se cultivaban en presencia de treponemas patóge--
nos muertos. Estos datos iniciales fueron confirmados -
por HANOT, GRAUDICKER, PUPIL (1966), CHIEREGATO y FALDA-
RINI (1966-67-68), HEITMANN (1969), MEZZADRA (1969), SI-
MON (1969).

THOR y col en 1963 pone en marcha la prueba de inhi
bición de los macrófagos, consistente en suprimir la ac-
tividad migratoria normal de los macrófagos al poner en
contacto estas células con los linfocitos de personas -
previamente sensibilizadas a un antígeno.

MOLLER (1965), HOLM y col.(1967) y modernamente --
GRANGER (1968) ponen en marcha la metódica que valora la
actividad citotóxica de los linfocitos en vitro. Esta -
prueba consiste en que los linfocitos de los animales -
sensibilizados a un antígeno destruyen in vitro las célu

las o bacterias a las que se ha sensibilizado el animal donante.

También se está estudiando la supresión parcial o total de la inmunidad para de esta forma poder conseguir experimentalmente la evolución patogénica de la enfermedad. JANKOVIC (1962), DRESSER, MITCHISON (1968) lo consiguen empleando inmunosupresores químicos e irradiación total; GRABA (1968) provocando un estado de tolerancia al antígeno y modernamente con el suero antilinfocitario que preconizó con tanto éxito JAMES en 1967.

MORFOLOGIA Y COMPOSICION QUIMICA DEL TREPONEMA

El estudio morfológico de las distintas formas que adopta el Treponema Pallidum es sumamente complejo. Por ello y para mejor comprensión vamos a estudiar esquemáticamente las formas menos importantes, deteniéndonos - algo más en las clásicas, y sobre todo dando una visión de los recientes hallazgos, que han contribuido a aclarar algunos conceptos, hasta hace poco tiempo muy confusos. Efectivamente, a partir de los trabajos de PI---LLOT y col. es obligado distinguir dos formas distintas de presentación: la típica y la atípica.

FORMAS TIPICAS

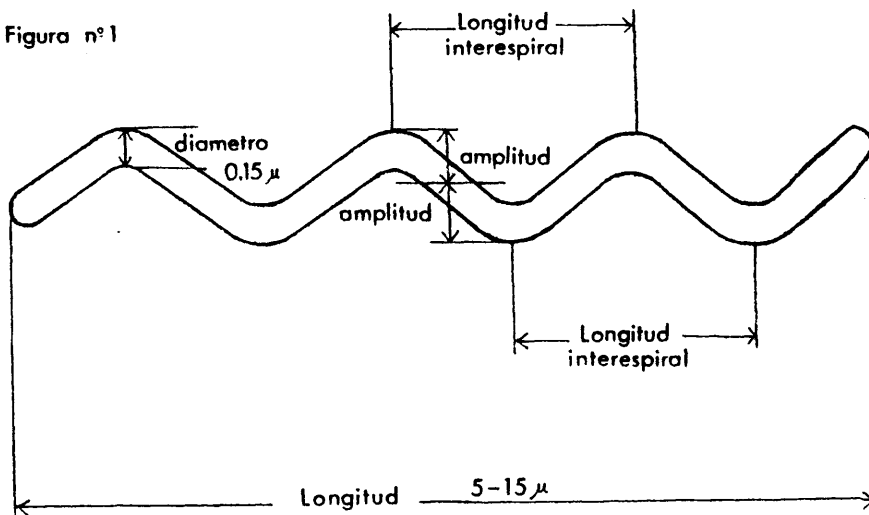
La estructura anatómica aunque casi está magistralmente descrita desde los tiempos de NAGUCHI (1928) fue confirmada y ampliada hace muy poco tiempo, gracias al microscópio electrónico, a pesar de ello no se puede de

cir que están resueltos todos los problemas en cuanto a su morfología; aun persisten algunas lagunas, debidas sobre todo a la fragilidad y la susceptibilidad a las variaciones osmóticas que presentan los treponemas patógenos, con la dificultad consiguiente de separar las características propias del germen de las de los artefactos - (Fig. 1 y Fig 2) de "Biologia Treponemei Pallidum" S. - Longhin. Bucares 1974.

El *Treponema Pallidum* (TILDEN 1937), es uno de los más delgados del género *treponema*, y se presenta en su forma más común, como un filamento cilíndrico enrollado en espiral sobre su propio eje, flexible, de diámetro medio transversal de 0,15 μ . por una longitud de 5 a 15 μ . Sus extremos son muy afilados. Presenta de 6 a 10 vueltas de espira, regulares y rígidas, que a veces pueden llegar hasta 30. El índice de Froilano Mello, es la relación que hay entre la longitud del parásito y el número de espiras. Este índice se mantiene constante.

Los estudios de la morfología del *treponema* por el microscópio electrónico han sido realizados por gran número de investigadores: MUDD y col. (1934), MORTON y OSKAY (1951-53), SWAIN (1955), PILLOT (1964), MOLBERRT (1971), OVCINNIKOW y DELERTORSKI (1965), SALLY JACKSON y BLACK (1971), y modernamente completados por JACKSON, -

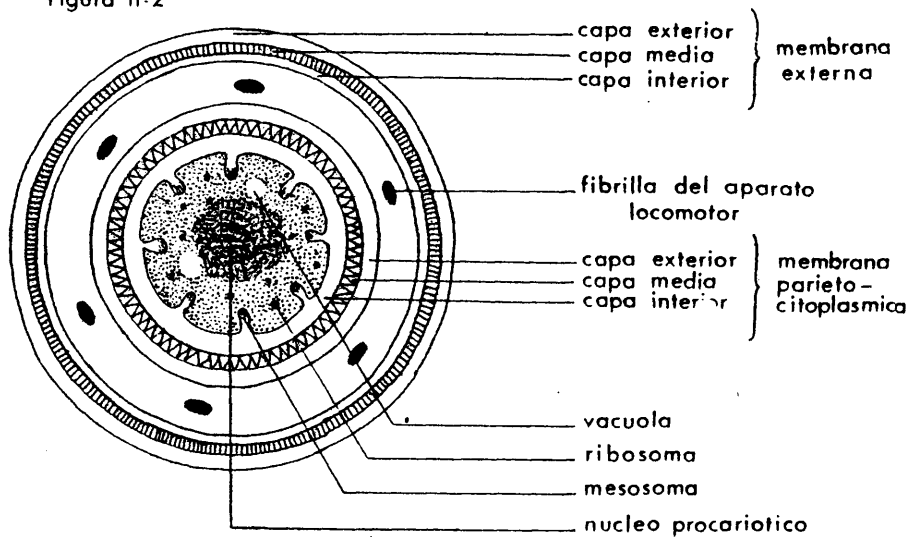
Figura n°1



TREPONEMA PALLIDUM : DIAGRAMA LONGITUDINAL

SEGUN HOVIND-HOUGEN

Figura n°2



TREPONEMA PALLIDUM : DIAGRAMA DE LA SECCION TRANSVERSAL

SEGUN LONGHIN

ZEY (1973), SYKES y MILLER (1973-75), ROVINDHOUGEN -
(1974-75-76-77) BLANKQUET (1976), STANEY y HOLT (1978).

Puede admitirse que los treponemas estan constituidos sobre todo por una masa celular procariótica con zonas de desigual densidad, rodeada de dos estructuras membranosas, cada una de 7 a 15 A° de espesor y un órgano locomotor situado entre las dos membranas. En el citoplasma hay un retículo endoplásmico, ribosomas vacuolas y mesosomas.

MEMBRANAS. - El treponema está rodeado de dos estructuras membranosas, trilaminares, cada una aproximadamente de 8 A°. Las membranas han recibido diversos nombres siendo los más generalizados el de capa externa o envuelta celular externa que posiblemente corresponde a la membrana celular externa de las bacterias gram negativas; - la segunda membrana se denomina citoplasmática.

La estructura exterior de la célula treponematosa, es una delgada membrana trilaminar, débil, elástica y no responsable de la forma helicoidal del treponema pues al romperse por el aumento de la presión osmótica el treponema no pierde su forma helicoidal habitual; igual ocurre si usamos cualquier medio de destrucción de la mem--

brana externa SWAIN (1955), MOLBERT (1956), BLAKEMORE -- (1973), GLAUERT (1974), HOVIND-HOUGEN (1974-75). Esta ca pa varia desde una fina estructura pulida, lisa y no tex turada hasta una capa muy compleja con una especie de subunidades poligonales como las de *T. microdentium* que tienen 8 nm. de diámetro y estan separadas entre sí por un espacio de 2 nm. HOVIND-HOUGEN (1974), LISTGARTEN y SOERANSKY (1964-65) en algunas espiroquetas no cultivables y algunos treponemas, han observado en la membrana algunas estrias como efectuadas con un alfiler, estas es trias son paralelas de 15 a 16 nm. de diámetro y separadas entre sí por un espacio de 5 a 6 nm. Parece que son el resultado de pliegues de la membrana externa, como también pudieran corresponder a dos capas con subunidades que a menudo no se pueden discernir. LISTGARTEN (1965).

En las cepas de treponemas cultivables *T. refringens* y *T. genitalis*, en la vaina externa tratada por enzimas o detergentes observamos agujeros, anillos o depresiones de forma exagonal o pentagonal en filas muy apretadas. La parte central de esta subestructura tiene de 4 a 10 nm. y los agujeros de 5 nm. HOVIND-HOUGENK (1975-76). En el *T. phagedenis* cuando se examina su membrana no se en-

cuentra en ella ninguna clase de detalles. Estas diferencias en la estructura de la membrana externa, reflejan diferencias en la composición química y distinto comportamiento ante los anticuerpos.

La composición química de la membrana externa aún no se conoce con precisión, se sugiere que tiene que ser muy compleja por la sensibilidad que tiene a los disolventes orgánicos, a los detergentes y a un gran número de compuestos ZEIGLER y ESATINE (1975). En los treponemas *T. phagedenis*, *T. KAZAN* y otros treponemas cultivables encontramos que el extracto seco contiene de 4 a 5% de lípidos, 73% de proteínas y un 2% de carbohidrato.

Cuando hacemos un análisis de material tratado con sustancias que disocian la membrana, y más tarde por medio de iones divalentes podemos reagregar nuevamente dicho material, nos encontramos que el 50% de estos reagregados están formados en su totalidad por glucosamina y galactosamina. De todas las maneras hasta que no consigamos un marcador específico de la membrana, la composición química será incierta.

En el *T. phagedenis* no se detectan los peptidoglúcidos, ac. murámico y l. ornitina. En el *T. Kazan V* y en el *T. phagedenis* nos encontramos que el 57% de los lípi-

dos están formados por fosfolípidos siendo mayoritaria -- la fosfatidilcolina con pequeñas cantidades de fosfatidiletanolamina. El monogalactosildiglicerido representa el 43% de los lípidos polares entrando en su composición -- los ac. grasos y oleico como más abundante.

Capa lipopolisacarídica..- Algunas comunicaciones -- indican la presencia de una capa de lipopolisacáridos -- (L.P.S.) en los treponemas..El estudio de esa capa al -- microscópio electrónico en el T. pallidum de Nichols extraída con fenol nos indica que contiene diferentes entidades morfológicas de partículas esféricas de 14 nm. de diámetro, así como estructuras de forma de cintas, o de masas. La forma de cintas es la predominante cuando la -- liofilización del L.P.S. se ha hecho antes de hacer las preparaciones para el microscópio electrónico. Estas estructuras morfológicas son similares a las que se obtienen del L.P.S. de las bacterias gram negativas, LOPES y col. (1970). La exacta localización física de dicha sustancia en los treponemas no es conocida. Pillot en 1965 sospecha que esta capa peptidoglúcida en el T. de Reiter es externa a la membrana plasmática cuando previamente -- se le ha quitado la capa externa del treponema. Esta localización viene avalada, por el hecho de conservar su --

forma el treponema, cuando se le ha quitado la membrana externa; como sabemos, la sustancia responsable de mantener la forma en las bacterias es una membrana formada por la capa peptidoglúcida. La capa externa contiene además de proteínas y lípidos, polisacáridos que son antigénica e inmunológicamente específicos no solo para todos los treponemas sino también para cada uno de ellos.

Algunos treponemas, concretamente *T. pallidum* de Nichols extraído de muestras recientes de testículo de conejo, no es aglutinado por los antisueros derivados de los antisueros específicos TURNER y HOLLANDER (1950-54) aunque estos treponemas sí son aglutinados cuando pasan unas horas. Se pensó que algo fuera de la membrana externa protegería al treponema y el microscopio electrónico vino a demostrar esta presunción. ZEIGLER (1976) empleando la tinción del rojo rutenio ha podido comprobar una delgada capa externa opaca al microscopio electrónico -- con fibrillas interconexionales entre treponemas adyacentes. Esta capa externa positiva al rojo rutenio se fija solo cuando empleamos glutaldehído, fuera de este producto, las células pierden esta barrera que rodea a los treponemas. Se piensa que la composición química de este material tiene que ser un mucopolisacárido dado el mecanismo de tinción tan específico que tiene estos productos --

cuando se emplea el rojo de rutenio. Sea lo que fuere de lo que está compuesto este material creemos que tiene -- que tener vital importancia para la patogenidad y adherencia bacterianas, GIBBONS y PATE (1975). El *T. refringens* de Nichols y el *T. phagedenis* Reiteri son negativos al rojo de rutenio. Esto no está en contraposición con -- que otros treponemas lo posean, como los treponemas patógenos, o puedan tener otro material distinto asociado a la superficie externa, JONES y ZEIGLER. No está claro si estos materiales son producidos por los treponemas o son formados por el huesped como defensa a la agresión de la espiroqueta JONES (1978). Esta barrera externa que aparece en el *T. Pallidum* contribuye a la integridad morfológica del treponema porque si tratamos al treponema con tripsina, complemento, butanol pepsina incluso con lavados repetidos de solución salina, resultan dañadas las células, cerca del 92% perdiendo su virulencia y movilidad activa, JONES (1968), FITZGERALD, JOHNSON y WOLFF -- (1978).

Aparato locomotor. -- Los treponemas tienen un aparato locomotor semejante en muchos aspectos a los flagelados, pero de localización característica. Está formado -- por dos bandas o fascículos de tres fibrillas cada uno --

permaneciendo separadas entre sí las fibrillas de cada - fascículo, (Wiecard 1922 y Bradfield 1952).

Estas fibrillas, se insertan en los extremos en u-- nos gránulos densos en la porción subterminal del proto- plasma. Desde allí, atraviesan la membrana interior y pa- san al espacio intermembranoso, desde el cual se extien- den hasta el otro extremo de la célula y aún la sobrepa- san; en su camino se enrollan sobre el cuerpo del trepo- nema. En la mayoría de los casos su porción terminal es- tá libre pero se mantiene dentro de la membrana exterior, incluso cuando las fibrillas son más largas que el cuer- po celular. Sin embargo, algunos autores consideran que en ocasiones pueden volver a entrar en el citoplasma y - reunirse en la parte media de la célula (Ovcinnikov y -- Delektorskij 1969). A veces, sobre todo en los trepone-- mas alterados, las fibrillas aparecen fuera de la mem--- brana del gérmen dando una falsa imagen de flagelo, por lo que algunos autores, creían sin lugar a dudas que es- tas prolongaciones eran el verdadero órgano locomotor.

Esta situación interna del aparato locomotor es la única diferencia que lo separa de las bacterias gran ne- gativas.

En estas fibrillas, similares a los flagelos proca-

rióticos, se puede distinguir una cubierta externa, la punta y el aparato de inserción o nódulo terminal que a su vez está representado por un engrosamiento o disco anular y un gancho proximal. La punta, cuya estructura es filamentosa o globular, similar a la punta de las bacterias flagelares, ABRAAM (1970). El diámetro medio de las fibrillas suele estar en los 18 nm., siendo el correspondiente al T. Pallidum de Nichols de 16 a 22 nm. La longitud de las fibrillas es muy difícil de determinar, porque en su determinación, siempre se han encontrado rotas debido a la dificultad de su separación, dada su situación interna.

El diámetro de la fibrilla no guarda relación con el tamaño de los treponemas.

La fibrilla, tiene una envuelta formada por una cubierta externa que incluye una parte central o medular de 10 a 16 nm. de diámetro, en estrecha relación con la membrana. Esta porción medular está formada por filas longitudinales de subunidades globulares JACKSON y BLACK (1971), JOSEPH y CANALEPAROLA (1972); estas subunidades globulares, son fácilmente apreciables en las preparaciones de fibrillas axiales congeladas.

En el T. de Nichols se ha observado, en sus fibri-

llas axiales, una vaina estriada que las rodea por completo de un diámetro de 15 a 20 nm. Se discute hoy día - si esta vaina estriada es una verdadera estructura de las fibrillas, o es un artefacto.

La porción medular de la fibrilla axial es granular

El aparato de inserción es una estructura bien diferenciada en forma de bulbo terminal formado por una porción proximal (corazón) y un disco de inserción.

Junto al filamento o porción terminal existe una superficie como un panal de miel ensanchado en la punta, - de 14 a 17 nm. de grosor y de 40 a 70 nm. de longitud, - curvado suavemente dentro del cilindro protoplasmático - HOUVIND- HOUGEN (1972-74-75), HOVIND-HOUGEN, ANDERSEN -- (1976), JACKSON (1973). Sin interrupción, saliendo del - corazón se puede observar un disco, llamado disco de inserción, con unas pequeñas depresiones o cuellos: El número de cuellos y discos es diferente para cada género - de gérmenes, en el T. Pallidum de Nichols solamente se - puede apreciar un solo disco de inserción de unos 35 nm. de diámetro. HOVIND-HOUGEN (1976). En los treponemas cultivables JACKSON y col. (1976), han observado de uno a - tres discos de inserción de 30 nm. de diámetro. El disco está insertado en un agujero o depresión subterminal en

el cilindro protoplasmático entrando en profundidad unos 0,10. nm. desde el polo celular HOVIND-HOUGEN (1976).

La composición química del filamento axial nos revela que está formado casi exclusivamente por proteínas. - Además se pueden detectar pequeñas trazas de pentosas y exosas. La composición de las proteínas axiales revela - que estan formadas por los aminoácidos siguientes: ac. - aspartico, alanina, leucina, glutámico y glicina. Estos aminoácidos, son los mismos que entran en la composición química de los flagelos bacterianos; como a estos también les falta la cistina, thriptofano y la tirosina. La falta de la cistina, sugiere que la estructura macromolecular de las fibrillas no está basada en los enlaces disulfuro, corroborando este hecho, la falta de acción de las nucleasas o las proteasas en la desnaturalización -- proteica junto a la falta de residuos de azufre en las - cenizas, así como tambien la gran sensibilidad que presentan a los agentes rompedores de puentes de hidrógeno. Las fibrillas, se diferencian de los flagelos bacterianos en que las proteínas axiales se disocian parcialmente a los 60°.

En algunos treponemas, se ha observado que hay diferente gradiente a la disociación química entre el cora--

zón y la punta de las fibrillas axiales, lo que nos hace pensar en ciertas diferencias en su composición química o en su estructura macromolecular ABRAM (1.970).

CILINDRO PROTOPLASMÁTICO.-- Directamente debajo de la vaina externa se encuentra el cilindro protoplasmático, que contiene la pared celular, membrana citoplasmática y el contenido citoplasmático. Desde PILLOT y RITER (1965) el complejo pared celular-membrana celular se denomina "membrana parietocitoplasmática" ya que es morfológicamente similar a la pared celular membrana celular de las bacterias gram negativas. Este complejo de membrana parietocitoplasmática está formado por dos capas opacas al microscopio electrónico separadas entre sí por un espacio transparente de 9 a 12 nm. de grosor, bien diferenciado en el T. genitales HOVIND-HOUGEN (1975).

En la pared celular se encuentra el estrato peptídico glucídico, similar en su composición química al de los organismos gram negativos. MARTIN HEILMANN (1972) con excepción de la l. ornitina; aunque también se ha encontrado en algunos treponemas como el T. phagedenis, T. phagedenis, T. REITTERI la ornitina junto con cantidades desiguales de ac. mureámico y glucosamina. La relación molar de la l. ornitina, ac. glutámico, glucosamina, ac. -

murámico y alanina en el estrato peptidoglucido es de -- 1-1-1-1-1-4. La mayor cantidad de la alanina es debido a la necesidad de su utilidad para enlazar a la l. ornitina de los peptidos de las unidades adyacentes.

AZIMA y col (1975) analiza un extracto de la pared celular del treponema Reiter, descubriendo que son ricos en polisacáridos (90%) con solo un 2% a 5% de peptidoglucidos. Este treponema solo contiene la l. ornitina como ac. diaminado.

Fibrillas. En casi todos los treponemas, principalmente en los T. Pallidum de Nichols, T. pallidum de Reiter han sido descritos acúmulos de finas fibrillas que parecen estar asociados con el cilindro protoplasmático. OVCINNIKOV (1968) JACKSON y BLACK (1971). Morfológicamente son tres clases; fibrillas perimurales, asociadas a la capa exterior del cilindro protoplasmático; fibrillas asociadas a la membrana citoplasmica y fibrillas citoplásmicas que se extienden de la capa interna de la membrana citoplásmica hasta la zona del área nuclear. JACKSON y BLACK (1971), EIPERT y BLACK (1976). Se discute la función de estas fibrillas, pues mientras EIPERT (1976) afirma que son las responsables de mantener la forma espiral de los treponemas, HOVING-HOUGEN (1976) -

les asigna la función de intervenir en la división nuclear. Químicamente se observan diferencias entre las fibras axiales y las citoplásmicas, estas últimas son sensibles a los enzimas proteolíticos, la urea, el ácido clorhídrico y bases diluidas. Su composición es lipoproteica estando constituidas por el 10% de lípidos 10% de carbohidratos y el resto proteínas formadas por los siguientes aminoácidos: glicina, a. aspártico, leucina, a. glutámico, alanina. Los ácidos grasos predominantes son el 12 metil, tetradecanoico, 13 metil-tetradecanoico y el hexadecanoico.

Membrana Citoplasmica. - Como ya hemos señalado la membrana más interna del complejo pared celular-membrana celular es doble, y morfológicamente similar a la membrana citoplasmática de las bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. La membrana citoplásmica en los treponemas no ha sido todavía aislada por lo cual no son totalmente conocidas sus características fisicoquímicas aunque sí podemos afirmar que se trata de una membrana de 6-8 nm. de grosor continua y asimétrica siendo la lámina externa más gruesa y densa que la interna. Esta asimetría de la membrana citoplasmática ha sido especialmente bien apreciada en diversos estudios efectuados en el T. Genitalis

(HOVIND-HOUGEN 1974).

Contenido citoplasmático.- Si efectuamos un corte transversal del cilindro citoplasmático podemos distinguir 3 zonas claramente diferenciadas. La más externa -- densamente granulosa, media con constitución mucho más -- homogénea y central densa correspondiente a la zona nuclear en donde se encuentran localizados los cromosomas. Las 3 zonas pueden estar surcadas o perforadas por los -- canaliculos o tubulos citoplásmicos así como por las fibrillas citoplásmicas provenientes de la capa interna de la membrana citoplásmica. HOCKSON y BLACK (1971), EIPERT y BLACK (1976). Los túbulos citoplásmicos son visibles -- sobre todo en treponemas patógenos cuando han sido dañados accidentalmente durante el proceso de preparación de muestras para el microscopio electrónico o cuando han sido tratados por el desoxicolato sodio o la proteasa 1 -- del Myxobacter AL 1. Estos túbulos citoplásmicos de 0,4 nm. de diámetro aparecen en madejas entrelazadas en el -- citoplasma celular. Su función no está actualmente del todo esclarecida, parece que hay una cierta conexión -- con la función flagelar aunque sin embargo no están relacionados con el número de tubos citoplásmicos y el número de fibrillas axiales treponémicas.

Estos tubulos citoplásmicos no solamente se localizan en la zona exterior del cilindro citoplásmico sino - que se encuentran asimismo en la región en que residen - los ribosomas e incluso en la zona nuclear.

En el cilindro protoplásmico de los treponemas encontramos además un retículo endoplásmico dispuesto en - forma de láminas y disperso sin lugar fijo.

Los ribosomas son pequeños gránulos o corpusculos - redondeados integrados en el retículo endoplásmico.

Las vacuolas se visualizan en los treponemas como - esferas refringentes repartidas por todo el citoplasma. A veces pueden llegar a romper la membrana citoplásmica semejando un falso pseudópodo dentro de la cavidad formada por las dos capas de membranas e incluso saliendo fuera de la vaina externa. En el interior del citoplasma se adivinan zonas nucleares filamentosas de una manera difusa.

Movimientos..- El aparato locomotor tan característico que poseen los treponemas, le da una activa movilidad pudiendo tener por lo menos cuatro clases de movimientos.

12) De rotación sobre su propio eje.

2º) Propulsión y retropropulsión sobre su eje longi
tudinal.

3º) De oscilación y flexión sobre el mismo eje lon-
gitudinal que semeja el movimiento pendular, y

4º) Un movimiento de reptación que según parece es
la conjunción de los movimientos anteriores.

Fácil de identificar por el examen en campo oscuro -
de CLARSPN (1956).

FORMAS ATÍPICAS

Generalmente las formas atípicas aparecen en situa-
ciones o medios que al treponema le son desfavorables pa-
ra su supervivencia y reproducción.

Hay formas largas, gigantescas, que aparecen en los
ganglios de los enfermos con disminución de la inmunidad,
bien de una manera natural o cuando han sido inmunodepri-
midos por alguna infección colateral que necesita de es-
ta terapéutica. También los treponemas presentan esta --
morfología cuando han crecido en exudados serosos. Cuan-
do se desarrollan en medios desfavorables se presentan -

como formas cortas y se admite hoy día como un estadio -- de resistencia y supervivencia. Esquemáticamente las formas que suelen presentar con más frecuencia en el ciclo evolutivo de su desarrollo son:

- a) formas redondas: son formas helicoidales -- que llevan un bucle o anillo en un extremo (forma helicoidal vesiculada) si no hay filamento será un esferoide que podrá estar compuesto bien por un treponema (uniespiroquetiano) o por más gérmenes (multiespiroquetiano).
- b) Formas granulosas: Se trata de gránulos fijos sobre la forma helicoidal. Algunos autores dicen haberlos encontrado libres --- Coutts (1953), otros sin embargo afirman -- que estos gránulos son verdaderos esporos que más tarde pueden dar lugar a trepone--mas activos.
- c) Formas de multiplicación: Que son reunio--nes de diferentes formas de treponemas formando dibujos característicos de estrella, soles, etc. Hay quien piensa que son focos de reproducción mientras otros autores, -- con los cuales compartimos su punto de vis

ta piensan que son zonas de aglutinación - de los treponemas por algún agente antimicrobiano o por aglutininas antitreponémicas que suelen tener todos los sueros, (que hacen que se unan estos treponemas).

Además de estas formas clásicas tienen interés citar las experiencias de Levaditi, Schoen, etc., que admiten la existencia de formas invisibles al ultramicroscopio, tal vez filtrables en los ganglios de conejo y de enfermos tratados que dan infecciones mudas y que son transmitibles por pases a otros sujetos.

Hay quien asegura haber encontrado en algunos medios y en experimentación animal formas L de treponema - pero aún no se ha podido confirmar este hecho. REITER (1968) OVEINIKOKI DELEXTORSKY (1969).

- F I S I O L O G I A -

Hasta hace poco tiempo no se han realizado estudios extensos sobre el metabolismo de los treponemas, debido principalmente a la falta de cultivo en medios artificiales de los treponemas sobre todo los patógenos y tam

bién a la complejidad de los elementos químicos que integran el medio base para lograr la supervivencia y reproducción de los treponemas no patógenos.

Luego lo poco que conocemos lo hemos obtenido por -- dos vías de investigación con los errores que estos estudios conllevan.

a/ Ensayos de cultivo in vitro de los treponemas patógenos.

b/ Las condiciones necesarias para cultivar -- los treponemas no patógenos.

La supervivencia de los treponemas hasta 30 días -- fué conseguida por NELSON (1948) demostrando con sus experiencias que para la vida del treponema, tenía que con tener el medio, entre otras cosas y potencial de oxidoreducción bajo con unos límites muy estrechos, precisados por METZGER; (1966), confirmados por RUBERSAACK (1967) -- para los treponemas bucales.

El crecimiento de los treponemas varia de unos a -- otros, los treponemas de la boca que crecen en un medio complejo con una D de 5×10^8 células por milímetro do-- blan su población en 12 a 14 horas, el T. Vicenti de 5×10^7 células por milímetro en un medio que contenga lí-

quido ascítico y el T. Reitteri con 5×10^6 células -- por ml. lo efectua en un medio que contenga suero de conejo.

La fuente de energía de casi todos los treponemas -- se la proporciona la glucosa, siguiendo la via de E.M. -- por fermentación a través del piruvato que actua como -- terminal aceptor de electrones siendo reducido a lactato. El treponema denticola cataboliza la l cisteina, glicina, l serina, l alanina, l arginina, l citrulina, l histidina así como los carbohidratos dando los productos de fermentación de acetato, lactato, succinato, sales de ac. -- fórmico, piruvato, etanol, CO_2 , sulfídrico y amoniaco. -- El acetato es el producto que más abunda en la fermentación no gaseosa.

Un hecho curioso se observa cuando examinamos los cultivos en los que han crecido el treponema denticola, encontramos glutamato y aspartato, pero ocurre que cuando añadimos estos aminoácidos al medio no se metabolizan, y así, cuando estos aminoácidos van unidos a peptidos o a proteínas. Este treponema usa la via de E.M. para degradar la glucosa mediante la Acetilcoencima A que es -- convertida en acetato a través de la acción de la fosfo-transacetilasa y la acetoquinasa.

En algunos treponemas se ha encontrado un citocromo, lo cual nos hace sospechar que estas especies podrían utilizar el O_2 molecular en determinadas condiciones KAWATA (1967) COX (1974).

Necesidades de Oxígeno..- Aunque no hay una estricta unanimidad de criterio, se admite generalmente que los treponemas, sobre todo los patógenos son anaerobios MORRISON (1941) NELSON (1948) ROSE (1952) BASEMAN (1974) etc.

Las pequeñas discrepancias sobre este punto se concretan en la opinión de varios investigadores que comunican haber observado una mayor supervivencia y virulencia cuando el cultivo se efectúa con un potencial de oxidoreducción electronegativo con pequeñas concentraciones de oxígeno (3-5%) COX (1977) NORRIS y Col. (1978) GRAVES y BILLINGTON (1979).

Las cepas de los T. PALLIDUM procedentes de los testículos de conejo, se ha demostrado que incorporan aminoácidos dentro de sus proteínas cuando están en atmósfera con un 10% de oxígeno, degradan la glucosa a CO_2 y acetato, piruvato y lactato. En condiciones anaerobias estrictas el piruvato y el lactato son los máximos productores de degradación de la glucosa en tanto que en completa --

aerobiosis se forman mayores cantidades de CO_2 y acetato.

FITZGERALD y col. (1975) demuestran que los treponemas pallidum extraídos del testículo de conejo mantienen más tiempo la virulencia cuando están incluidos en un -- cultivo celular en condiciones aerobias. Esta investigación sugiere que las células del cultivo son las responsables de reducir los peróxidos tóxicos para los treponemas, porque estas células testiculares poseen un peroxidodismutasa. Baseman y otros opinan que esto debe valorarse con mucha cautela pues en los treponemas pallidum extraídos del conejo hay la posibilidad de la coexistencia de cepas heterogéneas lo cual se demuestra por sedimentación graduada pudiendo obtenerse dos bandas diferentes -- que sería factible correspondieran a dos tipos distintos de treponemas que se cree pudieran interrelacionarse en los procesos infecciosos.

Otros autores por el contrario observan más favorables las condiciones anaerobias; así JONES (1976) cultivando los treponemas en células monoclonales de riñón de Hamster recién nacido, describe que conservan su virulencia al menos durante nueve pases, cultivando estas células en atmósfera de 7% de CO_2 .

METABOLISMO LIPIDICO.-

Los lípidos constituyen el 18-20% del extracto celular seco de los treponemas y ha sido objeto de numerosas investigaciones HOHNSON (1970), COHEN (1970), HOSEPH (1972), KONDO (1972), LIVERMORE (1972) etc.

En cuanto a los fosfolípidos el componente mayoritario de un gran número de especies es la fosfatidilcolina, en tanto que de los glicolípidos lo es la monogalactosilglicerido.

Los ácidos grasos treponémicos están en cambio condicionados por la composición en lo tocante a estos del medio de cultivo.

Hay treponemas que requieren un suplemento de ácidos grasos para su crecimiento generalmente combinado con albúmina.

Algunos treponemas son capaces de la síntesis de ac. grasos de cadena larga a partir de ac. grasos de cadena corta, por lo cual, es suficiente la adición al medio de cultivo de estos últimos. Así ocurre en el caso de los treponemas orales que requieren valerianato e isobutirato para la síntesis de las cadenas largas imprescindibles para su metabolismo.

En cambio otros treponemas no son capaces de la síntesis de los ac. grasos de elevado peso molecular a partir de los pesos inferiores; Así el T. Reiter y el T. Kazan 5 precisan un ac. graso saturado con 14 átomos de -- carbono y un ac. graso no saturado con 1 a 3 dobles enlaces en una cadena de 15 o más átomos de carbono. Ambos ácidos pueden ser reemplazados en el medio de cultivo -- por otro ac. graso de 18 átomos de carbono monoinsaturado en configuración trans; Igualmente estas necesidades han sido perfectamente comprobadas para el T. Vincentii. T. denticola. T. Scoliodontum, etc. El T. Kazan 5 y el T. Reiter aunque no pueden sintetizar ac. grasos de larga -- cadena, si son capaces de reducirlos, insaturarlos y modificarlos.

En cuanto al colesterol hallado en los medios de -- cultivo, es el resultado del colesterol componente del -- suero adicionado al medio y no del metabolismo treponémico.

Aunque el colesterol no es necesario para el crecimiento de los treponemas, al menos para el T. refringens aparentemente parece precisarlo.

REPRODUCCION

Los treponemas se multiplican casi siempre, aunque no invariablemente por división transversal, bien en -- dos mitades iguales o en dos partes de distinta longi-- tud. Esto se comprueba facilmente en los treponemas pro-- cedentes de lesiones sifilíticas en los primeros estadí-- os del chancro, pues es frecuente encontrar células in-- completamente divididas. No ha tenido apoyo científico, la discusión de si el treponema se divide por partición longitudinal, al observar formas en que los filamentos . terminales son dobles con formas en Y y en V; no han -- confirmado esta teoría las observaciones al microscópio electrónico.

C U L T I V O

Ha habido un sinnúmero de publicaciones que afirma-- ban que habían logrado conseguir un medio para el culti-- vo de los treponemas patógenos pero nunca se ha llegado a comprobar la eficacia en cuanto a reproducti-- bilidad -- de los cultivos encontrados en estos medios.

De todas formas, no ha sido en balde pues con estos medios aunque no se han podido aislar treponemas patógenos, si se han podido cultivar "in vitro" los treponemas saprofitos para el hombre. Se ha comprobado que forman un grupo muy heterogéneo en cuanto a su morfología y antigenicidad con diferentes exigencias nutritivas pero -- tienen de común, que todas ellas necesitan un pH excepcionalmente bajo y además disponer de una fuente de compuestos azufrados. Son anaerobios obligadamente. Los compuestos nitrogenados los pueden sacar de cualquier proteína natural, es suficiente el enriquecimiento del medio con suero.

Algunos autores, logran cultivar los treponemas patógenos en embrión de pollo, NEW COMER (1949) y BEARDMORE y DODD (1950), pero se piensa hoy en día que más que cultivo son supervivencias, poniendo en duda la multiplicación de los treponemas.

Ultimamente se afirma haber llegado a conseguir la multiplicación de los treponemas en cultivo de tejidos, perdiendo la patogenidad a partir del tercer pase. Estos medios de cultivos de tejidos no son un camino correcto porque la anaerobiosis no se puede mantener durante el tiempo necesario para un desarrollo apropiado del germen

cuya fase de división exige por lo menos treinta horas. JONES (1976), describe un cultivo sistemático de *T. Pallidum* en células monoclonales en riñón de Hamster recién nacido, logrando conservar la virulencia hasta el noveno pase y hasta la tercera generación de células en los subcultivos.

El germen, con independencia del medio en que se encuentre, necesita tener una temperatura con pocas fluctuaciones de la óptima, sobre 35°C.

CULTIVO IN VIVO

Hay que tener en cuenta, que una gran mayoría de los treponemas saprofitos tienen una gran ubicuidad y pueden entrar a formar parte de la flora microbiana normal de mamíferos y aves. En estado natural, sólo se observan treponemas patógenos además del hombre en los primates, con la excepción del *T. cuniculi*, que solamente resulta infecto-contagioso débilmente para el conejo el *T. hydrodysinteriae* que produce una disenteria del cerdo, KINYON HARRIS y CLOCK (1977). El conejo es el animal que mantiene y conserva en perfectas condiciones

la cepa de Treponema Pallidum intratesticularmente, siendo la fuente principal de donde nos proveemos del antígeno para las reacciones treponémicas que usamos en el laboratorio para el serodiagnóstico de las trepanomatosis.

Otro animal muy usado, ha sido el ratón común, animal de sencilla adquisición, con el único inconveniente de que se obtiene un rendimiento pobre en gérmenes.

ANTIGENOS DEL TREPONEMA

Los estudios inmunoquímicos se han hecho casi todos sobre las fracciones celulares del Treponema REITERI, -- gérmen fácil de cultivar "in vitro", con abundante rendimiento y economía.

El Treponema no es una unidad antigénica, sino que está constituido por un mosaico de diferentes antígenos. La mayor cantidad de estos, se extrae de la cubierta externa que contiene los dos tercios de la docena de los - antígenos identificados. La especificidad de los antígenos de la cubierta externa, está ligada a los poliósidos y - estos, son los más específicos de la especie.

El cilindro protoplásmico aunque representa más de las tres cuartas partes del Treponema, no es la mayor - fuente de antígenos, sólo está representando el antígeno proteico de grupo y reacciona con los sueros procedentes de los enfermos inoculados con cualquier especie de Treponema.

ANALISIS BIOLOGICO DE LOS ANTIGENOS

Se conocen actualmente cinco grandes grupos de antígenos, que producen otras tantas variedades diferentes - de anticuerpos, fáciles de investigar o mejor dicho de - diferenciar; de todas formas los estudiados más profun--damente, son aquellos que se encuentran en mayor canti--dad y mejor accesibilidad.

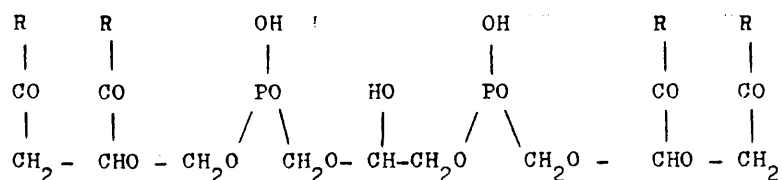
1) Hapteno Lipídico de Wassermann.- Como su nombre indica, es un hapteno descubierto por Wassermann en 1906. No solamente se encuentra en el treponema, sino que tam--bién está presente en los tejidos de los hombres y ani--males. Esta comunidad hapténica fue la causa que dió o--rigen a la gran confusión que marcó los principios de - la serología de la sífilis y se mantuvo hasta cerca de los años 50.

El hapteno de Wassermann está presente, no solo en el hígado y el corazón humano, sino también en otros te--jidos y órganos de los mamíferos; igualmente se detecta en los vegetales (zanahorias, guisantes, gérmen de tri--go, etc.), en ciertas bacterias (*Mycrobacteries*, *Esche--richia coli*, *Micrococcus lysodeikticus*, etc y notablemen

te en todas las clases de treponemas.

El hapteno de Wassermann fue aislado en estado puro del músculo cardíaco por MARIE PANGBORM (1945). FAIRE y MORELEC COULON (1958), precisaron los componentes que constituyen el cardiolípido, nombre dado al hapteno de Wassermann por ser la fuente de obtención el corazón, - cuya composición química es 1-3 difosfatidilglicerol. - Hay tres glicéridos unidos por dos ácidos fosfóricos -- quedando un hidróxilo medio libre; las cuatro funciones alcohol restantes están esterificadas por cuatro ácidos grasos no saturados en el carbono que ocupa el nº 18.

HASS (1965), logra la síntesis completa del cardiolípido cuya fórmula desarrollada queda como sigue



El comportamiento serológico del cardiolípido sintético no difiere en nada del cardiolípido natural.

Como hemos dicho anteriormente el antígeno de ---- Wassermann es solamente un hapteno. Es decir que el extracto lipídico del corazón o del hígado es incapaz de suscitar, en vivo, la formación de reagina. Después de -- la extracción, los lípidos no se vuelven inmunógenos na da más que copulados con proteínas (mejor con proteínas del suero del cerdo). La inmunización por bacterias cul tivables o por treponemas no patógenos, muy ricos en -- haptenos de Wassermann, no provocan la formación de rea gina. Estos hecho nos hacen pensar que el hapteno de -- Wassermann no se vuelve inmunógeno nada más que en condiciones muy precisas, que se dan solamente en las trepanomatosi, apareciendo la reagina, un anticuerpo muy específico de la sífilis venerea, del piam y de la pinta en los humanos y de la trepanomatosi del conejo.

Se ha estudiado el comportamiento del cardiolípido y los productos de degradación final para determinar -- donde se encuentra la mayor actividad inmunológica.

Los ácidos grasos son esenciales para mantener la actividad inmunológica "in vitro" del cardiolípido, --- pues es cada vez menos activo según se van perdiendo -- los ácidos grasos quedando sin ninguna actividad cuando ha perdido 3 ácidos grasos. La naturaleza de los ácidos

grasos tiene una importancia relativa, porque su saturación por hidrogenación sólo produce una discreta disminución de la actividad. Lo mismo ocurre con la función hidroxílica mediana cuando se satura.

La estructura de la cadena glicerofosfórica, interviene en menor medida que los ácidos grasos, siendo también indispensable para conservar la actividad inmunológica, decreciendo según disminuye el número de moléculas de glicerol (cardiolípido-fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico). El ácido fosfatídico sólo conserva una actividad muy débil para pasar a la lecitina que ya resulta inactiva.

La adición o la subtracción de átomos de carbono a la cadena que une los dos restos de fosfatidil, disminuye la actividad, lo que nos sugiere pensar que el anticuerpo podría reconocer una diferencia de longitud de la cadena glicerofosfórica correspondiente a un grupo metílico ($-\text{CH}_2-$) o sea a $1,3\text{\AA}$.

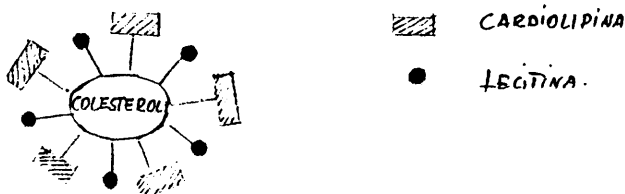
La configuración esteroespecífica del hapteno, no es esencial para la actividad inmunológica.

Los fosfatidos que poseen la propiedad idéntica al hapteno de Wassermann, pero que no provienen del músculo cardíaco, tienen una actividad inferior a la cardio-

lipina, definiendo su estructura química dentro de los límites de la inmunidad.

Con el aislamiento y síntesis del cardiolípido se comprueba que la actividad serológica era muy débil, aumentando en proporciones muy importantes cuando se le añadan ciertas sustancias inmunológicamente inertes, como la lecitina y el colesterol.

FAURE da una interpretación a este fenómeno; cardiolípido, lecitina y colesterol son solubles en los disolventes orgánicos, principalmente en el alcohol; por el contrario en el agua se dispersan en micelas el cardiolípido y la lecitina en tanto que el colesterol es completamente insoluble. Sin embargo cuando una solución alcohólica de estas tres sustancias mezcladas se dispersa en agua no se produce la floculación del colesterol, sino que estas tres sustancias se interaccionan formándose unas complejas micelas en las que el colesterol hidrofóbico constituye una partícula central



sobre la que se fijan la lecitina y el cardiolípido hidrófilos, estas dos últimas sustancias estabilizan la suspensión acuosa de colesterol impidiéndole flocular, entre tanto que el colesterol y la lecitina aseguran a los lugares antigénicos de la cardiolípina una disposición especial proporcionándole el máximo de posibilidades de reacción con la reagina.

La sensibilidad y la estabilidad óptima de la preparación depende:

- Los tres constituyentes deben estar en proporciones relativas bien definidas.

- El modo de la preparación de la suspensión acuosa

- Del tiempo que la suspensión lleve preparada ya que la asociación y orientación de las moléculas no es un fenómeno instantáneo.

La importancia de los factores inespecíficos en la actividad, "in vitro", del hapteno de Wassermann explica porque los serólogos durante mucho tiempo se inclinaron a considerar las reacciones efectuadas con preparaciones empíricas de este hapteno como no inmunológicas. El cardiolípido presenta una actividad cruzada con el DNA. Esta actividad podría implicar los agrupamientos fosfo---

diester de estas dos sustancias GUARNERI (1974), que se dan particularmente en las trepano-matosis.

2) Antígeno Proteico de Grupo

Descubierto por GAETHGENS en 1929, al comprobar que sueros de enfermos sífilíticos privados de la reagina, - siguen consumiendo complemento en presencia de treponemas de cultivo (T. reiteri).

Se ha encontrado en los treponemas patógenos y en los saprofitos pues la inyección de cualquier clase de treponemas muertos, hace aparecer la antiproteína anti-treponema. Como cualquier treponema creaba estos anticuerpos, al antígeno responsable se le llamó de grupo. Al determinarse su naturaleza proteica se le denominó, antígeno proteico de grupo. Se encuentra situado en la membrana externa y en el cilindro protoplasmático de todos los treponemas de cultivo, en los saprofitos de mucosas bucales y genitales del hombre, y también en los treponemas patógenos; es de naturaleza proteica, hidrosoluble y termolábil.

La mayor cantidad de antígeno se obtiene del T. reiteri, sobre todo cuando ha sido destruido por ultrasonido.

nido, lo que nos confirma la situación interna del antígeno.

La antiproteína de grupo no parece que se produzca fuera de las trepanematosis, y se encuentra dentro de las inmunoglobulinas M o G.

3) Antígenos Proteicos Específicos

Se sabe por pruebas de consumo de complemento que existen unos antígenos, también de naturaleza proteica diferentes a los de grupo, específicos para cada clase de treponemas. Se descubrieron al observar que los sueros procedentes de los enfermos de trepanematosis, no reaccionaban con los treponemas homólogos cuando previamente se les despoja de esta antiproteína y de las reaginas pero sí lo hacían con los otros treponemas de diferente naturaleza. Luego hay cierta especificidad antigénica a cada especie de treponema.

4) Antígeno Poliosídico

Es un antígeno que se encuentra presente en la cubierta externa de los treponemas, es de naturaleza poliosídica y no es absorbible por los sueros obtenidos -

con treponemas ultrasonados, pero sí por los sueros obtenidos por desnaturalización de las proteínas de los treponemas. No son antígenos rigurosamente específicos de los treponemas, pero sí resultan específicos de especie.

5) Antígeno Galactoglicérido

Es el antígeno últimamente descubierto: fue individualizado por DUPONEY en 1970, en el treponema de Reiter.

Este antígeno reacciona con los sueros obtenidos -- por inmunización con dicho antígeno, de todos los enfermos sífilíticos y hasta con sueros procedentes de algunos individuos sanos. Lo que demuestra que es un antígeno de grupo. Se ha comprobado que la naturaleza de este antígeno, no es proteica, sino galactoglicérida..

T A X O N O M I A

Desde muy antiguo, se ha dado una significación -- primordial a las características morfológicas para la clasificación de los microorganismos, desatendiendo otros -- criterios de mayor rigor científico y profundidad.

El grupo de bacterias llamado ESPIROQUETAS, orden - SPIROCHETALES, puede ser considerado un ejemplo en que el grupo ha sido denominado como resultado de la tendencia a atribuir valor filogenético e taxonómico a las características morfológicas.

Nosotros seguiremos esta norma y nos identificamos con el pensamiento del MANUAL DE BERGEY'S (1974), dado - que a pesar de sus limitaciones, es la clasificación mas universalmente aceptada.

LOS ESPIROQUETAS

ORDEN I - - - Spirochaetales.

FAMILIA II - Treponemataceae.

GENERO III - Treponema.

El nombre de treponema viene del griego, trepo --- (vuelta) y nema (hilo), hilo retorcido.

Son microorganismos con formas cilíndricas helicoidales y unicelulares de 5 a 20nm. de largo, por 0,09---0,5 de ancho. Poseen espiras apretadas, regulares o irregulares, con una fibrilla axial o más, que se insertan a ambos extremos del cilindro citoplasmático. Son móviles, gram negativo. Se tiñen con la impregnación de la plata y la coloración de Ryu (1963), tinción débil por el Giemsa. Se observan bien en fondo oscuro o con contraste de fase.

La ESPECIE tipo es: el treponema PALLIDUM (SCHAUDIN 1905).

La clasificación del Género Treponema ha sido poco satisfactoria y difícilmente utilizable en la identificación de especie.

La técnica anaeróbica de Hungate, modificada por - MOORE (1976) ha servido para cultivar muchas especies y obtener la mayoría de las características bioquímicas y biológicas de aquellos.

La clasificación de las especies cultivables, se - basa en el estudio de cepas proporcionadas por el V.D. R.L. del Centro Nacional de Enfermedades Transmisibles de Atlanta, USA.

Ciertos datos indican que la gama de huéspedes susceptibles, podrían ser un criterio válido para diferenciar las especies patógenas pero el número de cepas es tudiado hasta ahora, es demasiado escaso para que se - pueda recomendar el procedimiento.

Hasta que se disponga de información más amplia, parece conveniente seguir identificando las especies - de treponemas patógenos para los vertebrados, según la enfermedad que comunmente van asociados, y en otro grupo a las especies cultivables que no causan enfermedad treponémica (sífilis, piam o pinta) en el hombre o los animales como sigue:

CLAVE DE LAS ESPECIES DEL GENERO TREPONEMA

I.- Producen en el hombre y animales, sífilis, piam
opinta:

- a) Lesiones cutáneas en conejo, no la produce en
el hanster ni en caviar.

1.- TREPONEMA PALLIDUM

- b) Lesiones cutáneas en conejo y hamster no la pro
duce en caviar.

2.- TREPONEMA PERTENUE

- c) No produce lesiones cutáneas en conejos ham--
ster o caviar.

3.- TREPONEMA CARATEUM

- d) Lesiones cutáneas en conejos y caviar; no en -
hamster.

4.- TREPONEMA PARALUIS-CUNICULI

II.- No causan sífilis, piam o pinta en el hombre
o los animales y son cultivables:

5.- TREPONEMA PHAGEDENIS

6.- TREPONEMA MACRODENTIIUM

7.- TREPONEMA REFRINGENS

8.- TREPONEMA DENTICOLA

9.- TREPONEMA ORALE

10.- TREPONEMA SCOLIODONTUM

11.- TREPONEMA VINCENTII

También podemos asegurar que treponemas aislados - por diferentes investigadores y que se les ha dado como cepas nuevas se ha comprobado que pertenecían a las especies ya descritas.

Actualmente, creemos que se ha iniciado un nuevo camino al haberse logrado cultivar un treponema patógeno por KINYON y col. (1977), que produce la disentería del cerdo, el Treponema Hiodysenterías. Este treponema es - morfológicamente semejante a los treponemas humanos cultivados, por lo cual nos hace profundizar en estudios -

de genética para observar las diferencias existentes.

Al comprobar la composición básica del DNA en moléculas por ciento del contenido de guanina + citosina entre los Treponemas patógenos humanos, Treponemas cultivables no patógenos (*T. phagedenis*, biotipo Reiter, *T. Refringens*, biotipo Noguchi) y los Treponemas *hyodisenteriae*, encontramos que las cepas de los Treponemas del cerdo, dos patógenos y dos sapofritos, son genéticamente diferentes a las cepas de los Treponemas patógenos o cultivables humanos.

También nos indican estos mismos estudios, que las cepas patógenas del cerdo no son idénticas entre sí y lo mismo ocurre con las no patógenas pero están muy cercanas. Estas especies se pueden diferenciar por un distinto comportamiento antigénico.

La secuencia de las bases del DNA en los Treponemas patógenos y en los no patógenos, tiene un 28% de componentes homólogos, pudiéndose decir con este tanto por ciento que están claramente dentro del mismo género aunque pertenecen a distinta especie.

Los resultados de los estudios genéticos hechos por MIAO, HOWARD FIELDSTEEL y HARRIS en 1978, sobre las secuencias del DNA en el *T. Pallidum* de Nichols, nos indi-

dican que tienen una secuencia homóloga del 50% al compararlo con el DNA del *T. phagedenis* o el *T. refringens*. Sin embargo este dato no justifica una reclasificación de los treponemas cultivables no patógenos en un género distinto del *Treponema Pallidum*; no obstante, la gran diferencia en la composición básica del DNA entre el *T. pallidum* y los treponemas del cerdo, habla en favor de géneros separados para clasificar los treponemas aislados del intestino del cerdo, así como a otros treponemas similares morfológicamente aislados del tracto intestinal de otros animales (perros, ratas etc), a los que les producen infecciones intestinales.

M A T E R I A L Y M E T O D O

Desde 1965 venimos trabajando en este tema, en el Laboratorio de Serología del Hospital Clínico de Madrid, con la supervisión del Profesor Bravo Oliva, Catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid y Catedrático Regente del Servicio.

Para el presente estudio hemos seleccionado 453 enfermos sífilíticos, en periodo de actividad de la enfermedad o ya curados, procedentes de distintos servicios del Hospital Clínico de San Carlos, Dispensario Antivenéreo, Centros Hospitalarios de la Seguridad Social y de diversas instituciones sanitarias de todo el país.

También hemos añadido sesenta testigos exentos de cualquier contacto con la afección sífilítica, que nos han servido sobre todo para standarizar y constatar las técnicas empleadas. De estos testigos, treinta eran sonantes de sangre, los otros treinta restantes fueron es

cogidos intencionadamente entre enfermos de diferentes procesos patológicos no luéticos, con el fin de poder excluir una posible reacción linfoblástica o treponemica no específica.

Hay que hacer notar que entre el grupo de testigos sustituimos a tres enfermos que reaccionaban con una fuerte respuesta linfoblástica ante el estímulo de treponemas, y que estudiados exhaustivamente no se les pudo descubrir síntomas clínicos ni serológicos de un posible contacto luético. Estos enfermos que respondieron positivamente al T.T.L. padecían:

Un proceso de sensibilización al fósforo

Una afección neurológica congénita (Ataxia telangiectásica).

Un tumor del sistema reticulo-endotelial

La distribución por sexos nos señalaba una proporción de 393 varones por 120 hembras.

El número de enfermos con las determinaciones realizadas se reparte de la siguiente forma.

A)- 10 enfermos de sífilis primaria con 34 determinaciones.

B)- 13 enfermos de sífilis secundaria con 41 determinaciones.

C)- 23 enfermos de sífilis terciaria con 69 deter
minaciones.

D)- 185 enfermos de sífilis latente con 201 deter
minaciones

E)- 8 enfermos de sífilis congénita con 24 deter
minaciones.

F)- 17 enfermos de sífilis tratada y curada.

G)- 16 enfermos con falsas reacciones serológicas
positivas.

H)- 181 enfermos entresacados entre los grupos an
teriormente citados que después de dos años de trata--
miento, conservan pruebas positivas de F.T.A. Abs. o -
V.D.R.L. a diluciones inferiores a 8.

I)- Los 60 testigos sanos.

A todos los sueros estudiados se les ha practica-
do las serorreacciones clásicas de V.D.R.L., F.T.A. --
Abs., cuantitativo, así como el Test de Nelson, F.T.A.
Abs. con IgM y el Test de Transformación Blástica de -
los Linfocitos, además se les ha seguido su evolución
clínica y serológica en repetidas ocasiones.

A todos los enfermos se los ha separado en dos -
dos grupos: Tratados y no tratados. A los tratados se

les han hecho controles antes de los tres meses, después de tres meses hasta los doce meses, y un tercer grupo después de doce meses de haber iniciado el tratamiento antisifilítico.

A un grupo de enfermos también les hemos investigado los linfocitos T y B por la técnica de rosetas - pero por no haberlo realizado sistemáticamente en todos los sueros, no hacemos apartado especial, ya que la prueba de la transformación blástica nos ha proporcionado una perfecta información del estado inmunitario celular de los enfermos.

TECNICAS

V.D.R.L.

Es la reacción propuesta por el VENERAL DISEASE RESEARCH LABORATORY. Su antígeno está compuesto por - cardiolipina, lecitina y colesterol en solución alcohólica y reacciona frente a los anticuerpos reagínicos de los sueros sifilíticos, de forma bastante específica (90%). Su técnica es sencilla. aconsejamos preparar las dosis recomendadas para evitar errores en la reacción. Así pues: 0,4 ml. de solución salina tamponada

nada de fosfatos de pH = 6, preparada lo más recientemente posible, se le añade gota a gota a la vez que se rota 0,5 ml. de suspensión de antígeno, soplando finalmente la pipeta para su mayor exactitud, en el fondo de un frasquito de 20 ml. de capacidad aproximada. Seguidamente añadimos de nuevo 4,1 ml. de la solución tamponada y agitamos bruscamente durante segundos para asegurar una perfecta homogeneidad.

Se toman 0,05 ml. de suero límpido e inactivado a 56°C durante 20 minutos, y se coloca en una placa de Kline; a continuación enfrentamos este suero con el antígeno anteriormente preparado, adicionando una gota de éste con una jeringuilla cuya aguja posea un calibre que permita el paso de 60 gotas por mililitro. Se lleva la placa de Kline a un agitador horizontal y pasados cinco minutos se leen los resultados. Estos se ven a menudo a simple vista o mejor provistos de una lupa.

Se consideran positivos, los sueros en que aparecen aglutinadas las agujas de cardiolipina y negativos, los sueros en que están perfectamente separadas. Fotos nº 1 - 4.

Los sueros positivos, se valoran cuantitativamente por dilución con cloruro sódico al 90%. Las dilu--

ciones generalmente se darán al doble. El título final será la máxima dilución del suero en que se obtiene resultado positivo.

En Madrid, en el año 1958 se instaló la Escuela Central de Serología, aneja a la cátedra de Dermatología, que desde entonces practica sistemáticamente dicha reacción reagínica para screening.

Períodicamente el Serum Institute de Copenhagen, se ha encargado de enviar sueros titulados para evaluar la exactitud de las reacciones empleadas, pudiendo así la Escuela Central de Serología de Madrid, reunir archivos con la cantidad de 512.122 sueros debidamente estudiados con más de dos reacciones efectuadas.

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA - F.T.A. Abs.

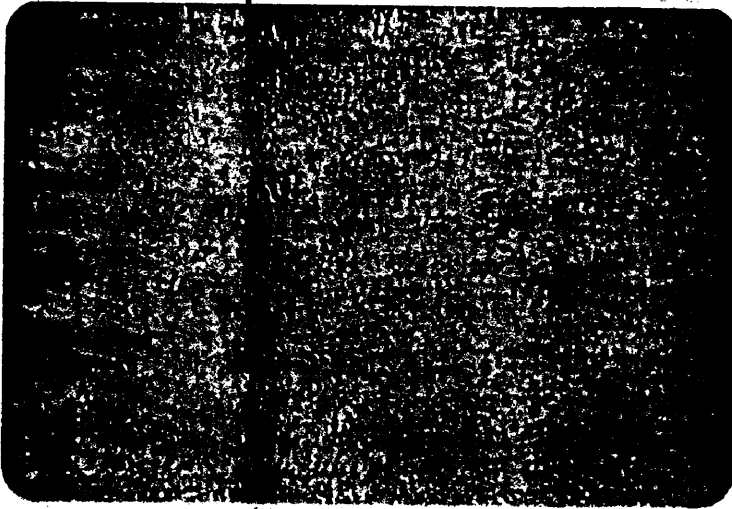
(Fluorescent Treponemal antibodies)

1º Fundamento

Fluorescencia es la capacidad que tienen ciertas sustancias de que al recibir radiaciones luminosas, - devuelven otra distinta a la recibida, de diferente - longitud de onda. Si el fenómeno dura tan solo mientras llega luz incidente, recibe el nombre de fluorescencia, y si persiste después de algún tiempo de ce--

72

V D R L



Ref. N° 1

V.D.R.L. NEGATIVO Aumento de 100 X



Ref. N° 2

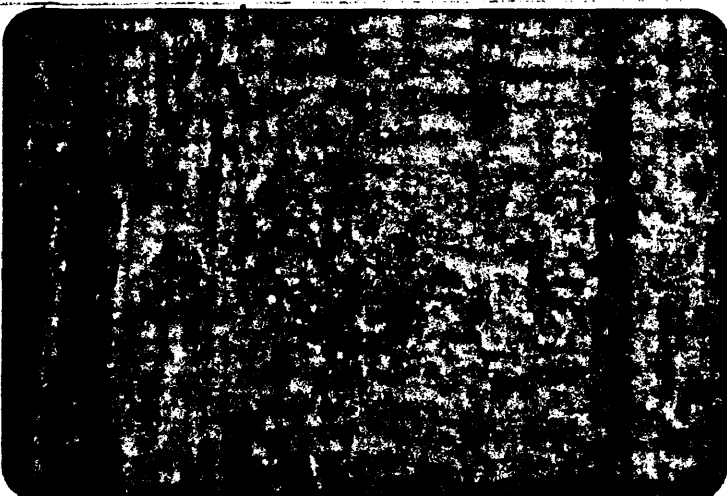
V.D.R.L. POSITIVO dilucion 1/8 Aumento 100 X

V D R L



Fot 553

V.D.R.L. POSITIVO a la dilucion 1/4 Aumento 100 X



Fot 554

V.D.R.L. POSITIVO : dilucion 1/64 Aumento 100 X

sar la radiación excitadora se llama fosforescencia.

Según la ley de Stokes, la luz de fluorescencia es siempre de una longitud de onda mayor que la de la radiación excitadora. Por eso, el fenómeno se hace más patente si se provoca con radiaciones ultravioleta de pequeña longitud de onda e invisibles, haciéndose en cambio patente la radiación devuelta, -- que pertenece ya a la región del espectro perceptible al ojo humano. Hay cuerpos que espontáneamente poseen esta propiedad, es la fluorescencia primaria; a otros cuerpos se les puede conferir por medios artificiales, denominándose entonces fluorescencia secundaria, y llamándose fluorocromo a las sustancias que se emplean para tales artificios. Estos al proporcionar esa capacidad realizan una unión o conjugación mediante íntimas reacciones intermoleculares -- con el cuerpo que impregnan.

Los fluorocromos tienen que reunir unas características que los haga idóneos para estas técnicas:

a) Poseer grupos químicos capaces de combinarse de una manera estable con la proteína.

b) Gran poder de fluorescencia y que no se vean afectados tras la conjugación.

c) No influir en las propiedades biológicas de las globulinas.

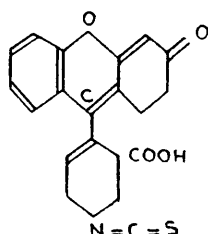
Se han llegado a descubrir tres grupos químicos no fluorocromos, capaces de acoplar un fluorocromo a la proteína.

- Los cloruros de ácidos sulfónicos $R - S \begin{array}{l} \nearrow O \\ \searrow O \\ \quad Cl \end{array}$
- Las sales de diazonio $R - N = N - Cl$
- Los isocianatos o isotiocianatos $R - N = O$
 $R - N = C = S$

Del primer grupo, en 1954 CLAYTON y en 1958 -
MAYERBACH, emplean como fluorocromo marcador de proteínas el ácido 1-dimetilaminonaftilsulfónico-5 (DANS) -- que proporciona una fluorescencia verde intensa.

Del segundo grupo, CHADWICK y col. en 1958, utilizaron la Lisamina-Rodamina B (RB-200) de fluorescencia roja.

Pero sobre todo, el fluorocromo que más se ha usado y se sigue usando actualmente para la visualización de los anticuerpos, es el Isotiocianato de fluoresceína, representante del tercer grupo implantado por ---
RIGGS y col. en 1958 que da un color verde manzana.



Este colorante fluorescente forma un enlace tio-carbamida con los grupos amino de la proteína.

Esta proteína, es una Inmunoglobulina que como todos los anticuerpos globulínicos tiene la particularidad de actuar como antígeno y producir anticuerpos -- contra ella (anti-anticuerpos). Por tanto, si a un animal se le inyectan una o varias globulinas humanas o de animales, obtendremos antiglobulinas únicas o totales de cada especie.

El complejo fluorocromo-inmunoglobulina antihumana se denomina conjugado.

Así en un primer tiempo se fija el anticuerpo sobre el antígeno correspondiente, previamente fijado a un porta; luego se eliminan por lavado los anticuerpos que el suero pueda contener y no hayan sido captados por el antígeno; en un segundo tiempo se ponen de manifiesto los anticuerpos que han quedado unidos al antígeno por la adición de la antiglobulina conjugada, la

cual si hay anticuerpos específicos se fijará sobre - ellos marcándolos y dándoles la propiedad de la fluo- rescencia que en definitiva es trans-mitida al antíge- no, siendo en este caso la reacción positiva. Si la - reacción es negativa, la antiglobulina no encontrará el soporte de los anticuerpos y se pierde.

MATERIAL

a) Antígeno

Treponema Pallidum, cepa NICHOLS, extraído del - tejido testicular del conejo previamente inoculado y suspendido en solución salina fisiológica, sin ningún aditamento, diluyendo la cepa hasta lograr que una go- ta de esta suspensión contenga 50 microorganismos por campo microscópico de 450 aumentos.

Esta suspensión, para su mejor conservación pue- de ser fraccionada en dosis de 0,25 ml. que se llevan a -20°C. Este antígeno se puede usar con perfectas ga- rantías hasta un máximo de tiempo de 18 meses. Ni la liofilización, ni la conservación en portas fijados - responden a las garantías requeridas de un buen antí- geno.

Habitualmente desde hace 15 años, hemos utilizado antígeno preparado personalmente en nuestro laboratorio, de mucha más garantía que los antígenos que actualmente hay comercializados.

b) Conjugado

Empleamos la globulina antihumana fluoresceinada correspondiente a las inmunoglobulinas que vayamos a investigar IgG, IgA, IgM, o IgD. Aunque se emplean - preparados comerciales que actualmente tienen suficiente garantía, solemos volver a titularlos para mayor seguridad.

c) Sueros problema

Deben ser recientes y no hemolizados, debiendo - mantenerse a 57°C, en baño María durante veinte minutos, para inactivar el complemento.

d) Disolventes

Se emplea una solución salina tamponada de fosfatos 0,5M, pH = 7,2.

e) Absorbente

Es un extracto sonificado de treponemas cepa Reiter, estandarizado, conteniendo antígeno de grupo; se encuentra fácilmente en el comercio (Diffco).

f) Medio para montar las preparaciones microscópicas.

Se prepara mezclando a partes iguales solución en Buffer de fosfatos y glicerina pura.

Solución salina tamponada:

Cl Na.....7,650 grs.

$\text{PO}_4^{\text{H}} \text{Na}_2$0,724 "

$\text{PO}_4^{\text{H}} \text{K}$0,210 "

agua destilada csp... 1000 ml.

g) Microscópio de fluorescencia

Consta de una fuente luminosa, juego de filtros y un microscopio con condensador de cuarzo para fondo claro y oscuro. La fuente de energía luminosa está -- constituida por una lámpara o tubo de mercurio a alta presión (alrededor de 35 atmósferas) del tipo HBO -- (doscientas horas de duración), con blindaje especial que lleva incorporado un espejo cóncavo que recoge to do el haz luminoso y lo envía hacia un colector de -- cuarzo, el cual a su vez lo hará pasar a través de los filtros. Esta fuente luminosa suministra abundante luz visible, y nos proporciona también la radiación exci- tadora de onda corta que necesitamos. La emisión es-- pectral de la lámpara de mercurio HBO 200 W está re--

presentada en la gráfica 1.

La intercalación de filtros entre la luz y el objeto, tiene la función de eliminar las radiaciones visibles, dejando pasar el haz de luz ultravioleta que se desee.

Estos filtros se denominan excitadores y los más comunes son:

BG - 38 Que siempre estará incorporado y se combinará con uno de los siguientes. Elimina el infrarrojo por lo cual se le llama anticalórico.

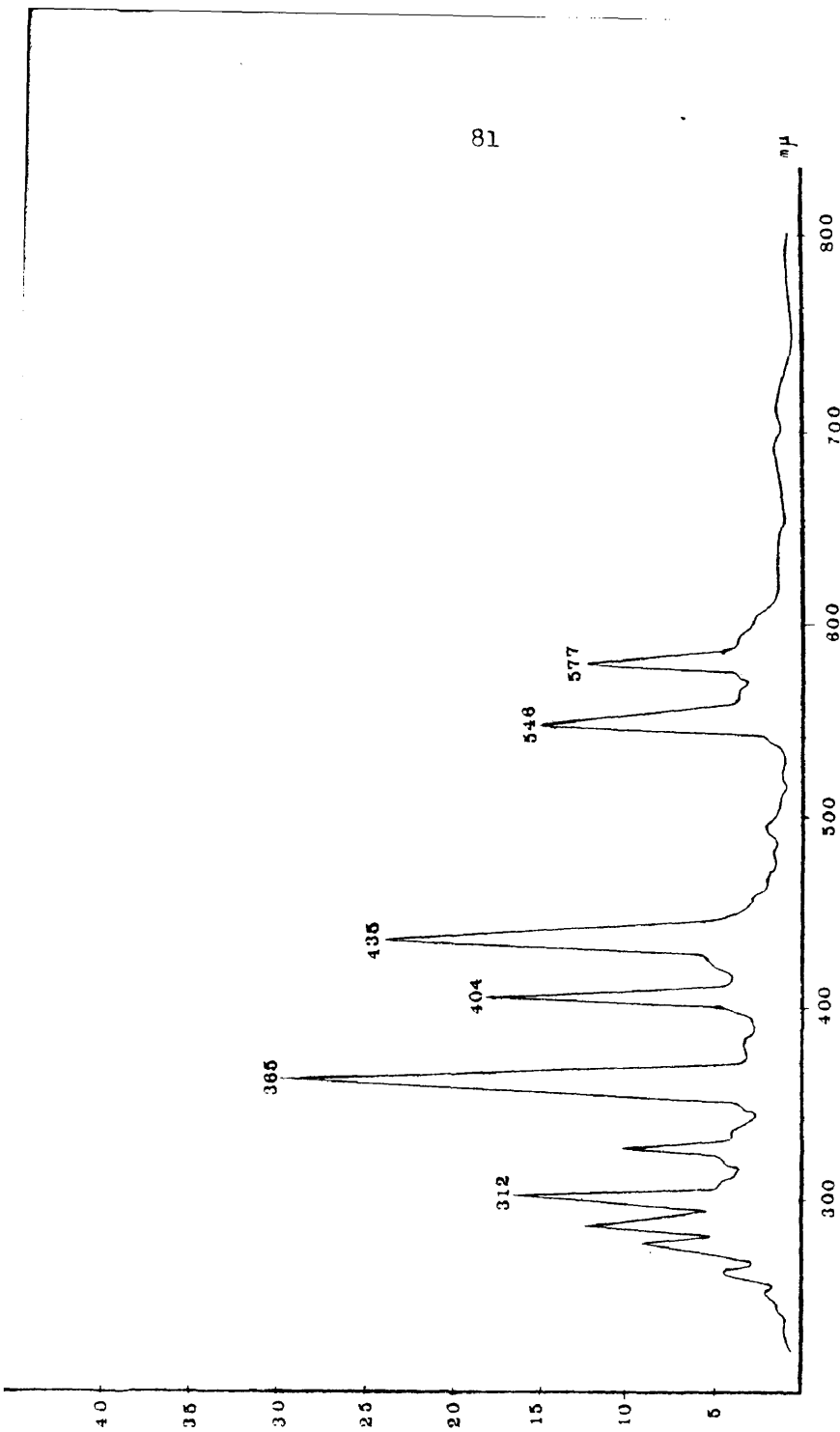
BG - 12 Permite el paso de luz entre 330 y 500 mμ. es el más utilizado, aprovecha los picos del espectro 365, 404, y 435.

BG - 3 Permite el paso en un intervalo de transmisión 270 - 480, y por encima de los 700.

BG - 1 Entre 300 y 400 y por encima de 700.

BG - 5 Entre 220 y 420 y por encima de 680.

Hay otros filtros de protección o de detención, sirven para proteger al observador de los rayos monocromáticos que no hayan sido interceptados por las partículas fluorescentes y que dañarían nuestra vista, pero sí permiten el paso de aquella luz visible fruto de la excitación del fluorocromo.



Emission espectral de la lampara de mercurio HBO 200 W

Estos filtros se designan con los números:

410, 440, 470, 500 y 530; indicando que no dejan pasar luz de longitudes de onda inferiores a la cifra que indican.

Para obtener el rendimiento máximo de este microscopio debe estar instalado en un cuarto oscuro. El microscopio que nosotros empleamos es el Universal Zeiss. Fot. nº 6.

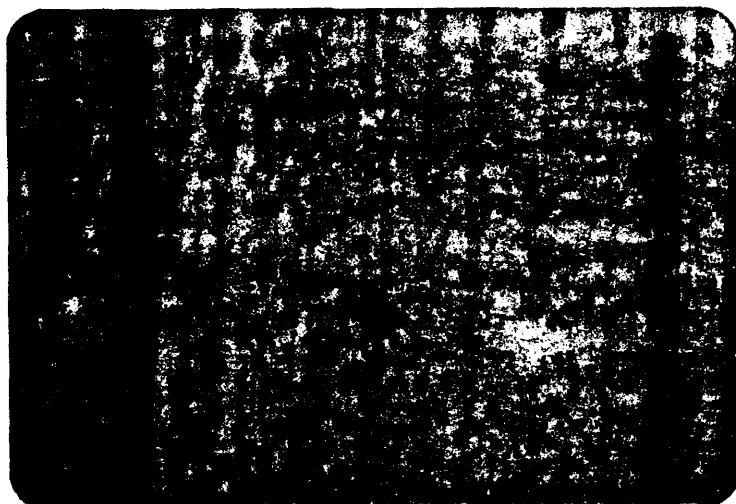
TECNICA

La técnica propiamente dicha de la inmunofluorescencia estandarizada por Deacon es muy sencilla y fácil de realizar, en cualquier laboratorio clínico, por disponer el comercio del antígeno correspondiente.

Es interesante hacer notar que son suficientes para su realización pequeñas cantidades de suero e incluso se pueden efectuar determinaciones sumamente útiles cuando hay que recoger una muestra problema en lugares muy alejados del laboratorio.

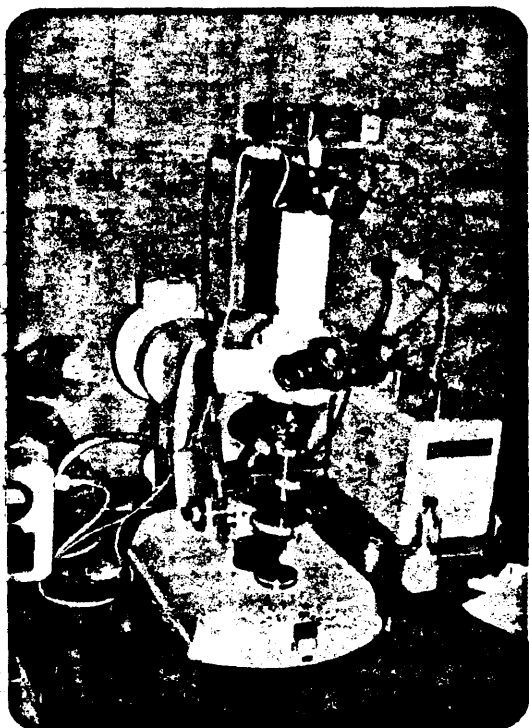
Consiste en poner frente a un frotis de treponemas cepa Nichols, previamente fijados en formol al 3%, el suero inactivo problema, diluido al 1/5 en el medio absorbente, y sometido a incubación húmeda a -

F T A A B S



Fotog. 5

F.T.A. POSITIVO Treponemas Fluorescentes 450 X



Fotog 6

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA UTILIZADO EN LA E.C.S.

37°C durante 30 minutos. Se lava tres veces con solución salina tamponada y se le añade a continuación -- 0,05 ml. de conjugado diluido (según el título obtenido en la valoración previa del lote). Se incuba nuevamente durante otros 30 minutos y se procede a un -- nuevo lavado con solución salina de fosfatos. Utilizamos la globulina de carnero antihumana Igs de Pasteur, código 74,511 con las características siguientes:

Fluorocromo.....	0,410 mg/ml		
Proteínas.....	34,8	"	"
Geef Molar F/P.....	5,3	"	"
Anticuerpos.....	6,3	"	"
Coeficiente A/P.....	0,18	"	"

Empleando una gota y media por centímetro cúbico de solución tampón (P.B.S.) conteniendo dos gotas de -- Twen 80.

Se montan las preparaciones para el examen microscópico poniendo entre porta y cubre una gota de -- líquido de inmersión. Es aconsejable, que se haga la lectura a continuación. No obstante, si por los motivos que sean, no se puede proceder a la lectura inmediata, se guardan los frotis en ambiente oscuro y a -- -4°C (en nevera). La lectura de las preparaciones se

debe realizar a 450 aumentos en un ambiente de mediana oscuridad, condición necesaria que debe reunir el lugar donde esté ubicada la instalación de microscopía inmunofluorescente.

En los sueros positivos, apreciaremos treponemas gruesos con una especie de película viscosa amarilla (son fluorescentes), mientras que en los sueros negativos, si se ve algún treponema es fino y sin ninguna fluorescencia. Antes de dar un resultado negativo, -- hay que comprobar la presencia de treponemas en el -- frotis, con el microscopio con condensador de fondo -- oscuro para eliminar la posibilidad de dar un resultado falso negativo, al no verse treponemas fluorescentes, que esto también se podría deber a que no hubiese ninguno por mala fijación de la preparación u o--- tras causas fortuitas. Después de esta primera valoración cuantitativa a los sueros positivos les hacemos diluciones partiendo de la que tiene el sorbent, con sol. sal. al 9%. Fotos nº 5-7-8.

TEST DE SCOTTI LOGAN

De la aplicación de la inmunofluorescencia indirecta al estudio de las distintas inmunoglobulinas na

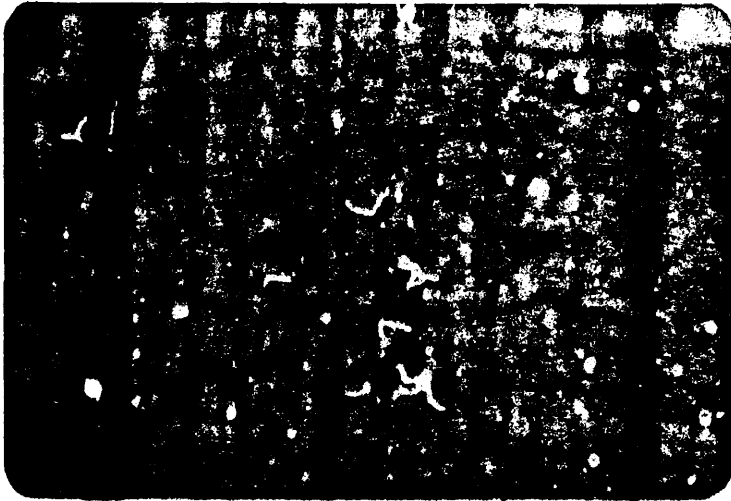
cen diversas reacciones con utilidad diagnóstica. La IgM específica aparece en gran cantidad en el suero -- de los pacientes con infecciones agudas, lo cual fue aprovechado para poner de manifiesto dicha enfermedad. Tal es el caso de la toxoplasmosis por Remington --- (1968), la rubeola por COHEN (1968), la inclusión cyto megálica por HANSHAW, STEIFELD y WHITE (1968), etc.

SCOTTY y LOGAN en 1968, basándose en idéntico -- principio utilizaron por primera vez la inmunofluores cencia indirecta con IgM para el diagnóstico de la sí filis congénita, ya que la IgM a diferencia de las -- restantes inmunoglobulinas no atraviesa la placenta -- debido a su elevado peso molecular y por lo tanto, si es detectada en el recién nacido se deberá a que este la ha sintetizado por sí mismo.

Hay casos muy concretos y especiales como son -- los de rotura placentaria en los que al producirse pa so de la sangre materna al niño, es posible que haya en la sangre neonatal IgM materna. Para eliminar esta causa de error, se utiliza la investigación de cerulo plasmina en ambos pacientes; este parámetro en el niño es de 4 a 5 veces menor que en la madre con barrera -- placentaria íntegra.

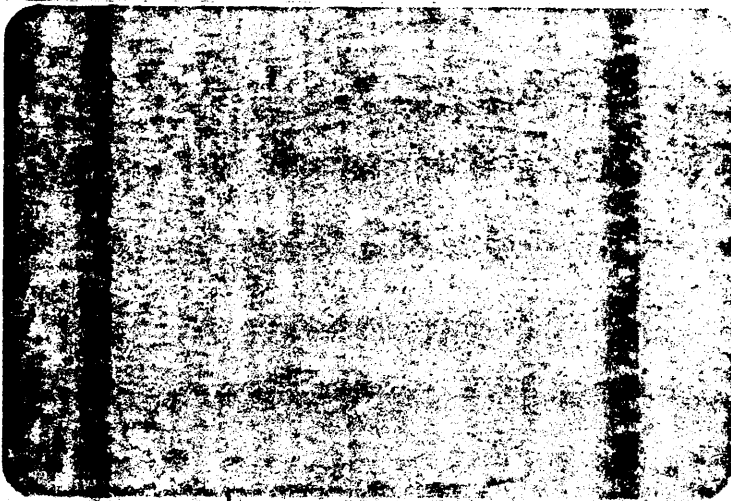
6-12-50

F T A A B S



Fotog 7

F.T.A. NEGATIVO Treponemas sin Fluorescencia
Aumentos 600 X



Fotog. 8

F.T.A POSITIVO Treponemas Fluorescentes
Aumento 600 X Filtro azul

Para la aplicación práctica de la inmunofluorescencia a la sífilis congénita, SCOTTY y LOGAN sustituyen el conjugado antigama globulina total isocianato de fluoresceína, por conjugados parciales específicos fluoresceinados de anti IgM.

TEST DE INMOVILIZACION DE NELSON (T.P.I.)

Es una reacción de fijación o desviación del complemento que solo se puede realizar en el laboratorio especializado. La técnica de la reacción fue introducida en España por el Prof. Gay Prieto al conseguir - becar personal técnico para su preparación en el Serum Institute de Copenhague y en el Instituto Fournier de París.

NELSON y MAYER (1949), y más tarde con DIESENDRUK (1952), establecieron las condiciones que permiten evidenciar un anticuerpo activo sobre *Treponema Pallidum*. Este anticuerpo ya descrito por TOURAINE (1912), es - diferente al correspondiente a la reacción de WASSER MANN, MAGNUSON y THOMPSON (1949).

Esta reacción de fijación o desviación del complemento, necesita para su realización, además del me

dio de Nelson, el antígeno, anticuerpo y complemento.

Antígeno: Es una suspensión en el medio aludido, de Treponema Pallidum de la cepa de Nichols extraído del testículo de conejos infectados por vía intratesticular.

Los conejos elegidos deberán ser: machos, adultos, jóvenes, con testículos bien desarrollados y -- dar en su suero la reacción de inmovilización negativa. Deberán estar sometidos a una alimentación rica en vitaminas, en especial carotenos, y sus alimentos estarán exentos de antibióticos.

La cantidad y la calidad de la suspensión de -- treponemas debe reunir unas condiciones mínimas para una buena conservación de la cepa; se admite generalmente que es necesario inocular en cada testículo -- 1,5 cm. de suspensión de una cepa de riqueza $2,5 \times 10^7$ - 5×10^7 de treponemas por cc., para evitar una incubación prolongada que permitiera la formación de anticuerpos antes de aparecer la orquitis.

Los testículos extraídos asepticamente entre el 7º y el 10º días, tiempo mínimo en aparecer la orquitis, son cortados siguiendo la técnica de Duser Bosel

y Sausse en láminas delgadas, y se introducen a partes iguales en dos tubos. A uno de ellos se le añade solución salina al 9%, y al otro 10 ml. de medio de supervivencia de los treponemas. La extracción se hace por agitación mecánica a 35°C con un agitador Wahn (350 agitaciones por minuto) durante 10 o 20 minutos, en una atmósfera conteniendo un volumen de CO₂ por 19 de nitrógeno.

Pasado este tiempo se trasvasan a sendos tubos de fondo cónico y se centrifugan a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos para separar las partículas del tejido testicular.

Por examen microscópico sobre fondo oscuro se controla la riqueza en treponemas del líquido de ambos tubos. Del que contiene la suspensión de treponemas en solución salina será del que prepararemos la dilución para inyectar en cada testículo de modo que posea 2,5 a 5×10^7 treponemas por ml.

Si el extracto testicular no contiene el número estipulado de treponemas, se concentra por centrifugación en frío y se vuelven a resuspender los microorganismos en una cantidad menor de solución salina fisiológica con 0,025 ml. de medio de Nelson.

El sobrenadante del segundo tubo que contiene -- una parte de testículo y una pequeña cantidad de medio de Nelson, se deposita en un matraz de Erlenmeyer estéril de 50 ml. Se ponen una o dos medidas, tomadas con un asa de platino (una medida de asa equivalente a 0,005 ml.) depositándolas en un porta, y se hace el recuento de treponemas por 10 campos de un microscopio de fondo oscuro con un aumento en seco (450 x).

Si lo hacemos con la impronta de dos asas de platino, el resultado representa el número de microorganismos por campo microscópico que se hallan en 0,01 ml de la suspensión de antígeno. Para emplearse en la reacción, la suspensión de antígeno debe ajustarse hasta que contenga 25 treponemas por campo microscópico de 450 aumentos. Esto equivale aproximadamente a $7,5 \times 10^6$ treponemas por ml.; como diluyente se emplea medio de Nelson.

Cuando la concentración de treponemas es inferior a 15 por campo microscópico, la reacción de inmovilización del *Treponema Pallidum* no se debe realizar.

La dosis necesaria para practicar la reacción de la suspensión ajustada de treponemas es de 0,3 ml. Para calcular pues, el volumen requerido de la suspen--

sión necesaria de antígeno ajustado (Treponemas), basta multiplicar por 0,3 el número total de tubos que intervienen en la reacción más una pequeña cantidad excedente.

La sangre obtenida del conejo en el momento de la extirpación de los testículos, se analiza mediante la reacción de inmovilización de los treponemas, para determinar si presenta anticuerpos; cuando es positiva - la prueba, esto nos indica que los microorganismos del testículo se han sensibilizado parcialmente por anti--cuerpos mientras estaban dentro del huésped; en este - caso la reacción de inmovilización con sueros desconocidos, carece de valor.

El medio sintético cuya fórmula ha dado Nelson - permite la supervivencia de los treponemas con conservación de su movilidad 10 a 15 días; PORTNOI en 1953, aumenta la movilidad de los Treponemas al añadir al medio tioglicolato sódico. AJELLO (1954), simplifica el medio al suprimir el ultrafiltrado de suero de buey. - El aporte de ácido thioglicólico a alta concentración, sustituye en mejores condiciones al thioglicolato de - sodio. BOAK y MILLER, recomiendan el empleo de una mezcla a partes iguales de suero normal de conejo inacti-

vado y de solución salina fisiológica. RANQUE, MOIGNOUX y DEPIEDS, utilizan sólo suero inactivo de conejo. RIVERO en 1974, logra aumentar la vitalidad y supervivencia añadiendo al medio insulina.

Todos estos cambios no han modificado en nada la esencia de la reacción. En definitiva, el medio básico de supervivencia de los Treponemas que usamos está constituido de la siguiente manera:

- Albúmina bovina cristalizada (factor V) al 5% en solución salina fisiológica.
- Solución tampon de fosfatos 0,15 M de pH = 7
- Solución de ácido thioglicólico, glutación, - clorhidrato de cisteína, piruvato de sodio y bicarbonato sódico.
- 300 unidades de insulina por 100 ml.

Además se le adiciona estreptomycin para impedir la contaminación de gérmenes, y penicilinasa para inactivar las posibles cantidades de penicilina - que puedan contener los sueros normales.

La mezcla de todas las soluciones se ajusta a un pH = 7,3 con hidróxido sódico. Se esteriliza por filtración con un filtro Millipore. Para su conservación

se distribuye en porciones de no más de 40 ml. y se mantiene en el congelador a -20°C ; el medio puede utilizarse durante dos meses después de su preparación.

Anticuerpo: Se encuentra como es lógico en el suero del enfermo. La extracción se hará en ayunas por punción, con rigurosa esterilidad y asegurándose de que no se encuentra en tratamiento con sustancias treponemicidas.

Los sueros se separan de los coágulos sanguíneos con pipeta o por decantación. La contaminación bacteriana abundante, produce muestras inadecuadas para la reacción, pero las contaminaciones leves pueden eliminarse haciendo pasar la muestra por un filtro Millipore en un adaptador SWINNEY. Si no se va a efectuar la reacción en el momento, se puede almacenar en un congelador a -20°C .

Complemento: El mejor es el que se obtiene a partir de la sangre completa extraída por punción intracardiaca del cobaya macho. Se utiliza una serie de 10-12 animales como mínimo. La mezcla de sangres una vez coagulada se centrifuga para separar los elementos formes del suero, y se procede después a la titulación con las técnicas habituales.

La titulación final debe quedar de forma que por cada 0,2 ml. de suero haya 200 unidades de complemento. Debe utilizarse preferentemente al día siguiente de la extracción, aunque si no se dispusiera con facilidad de complemento reciente puede utilizarse el conservado por congelación o liofilización.

Reacción: La técnica de Nelson como práctica Durrel y seguimos nosotros, supone el empleo de un testigo positivo o "Nichols pool" constituido por una mezcla de sueros de conejo infectados por el Treponema.

La reacción se efectúa en presencia de suero de cobaya. En el test de Nelson cualitativo no hay más - que un tubo de reacción por suero contenido:

Suero problema 0,05 ml.

Antígeno 0,30 "

Complemento 0,25 "

El complemento se distribuye después de 8 horas de sensibilización y actúa durante 16 horas.

El antígeno y el complemento estarán titulados - como hemos apuntado en la descripción respectiva.

Para cada suero se pone un tubo testigo, que con tiene los mismos componentes, pero el complemento ha

sido inactivado. Este tubo testigo permite eliminar - los sueros que poseen poder inmovilizante inespecífico (tras tratamiento peniciclínico por ejemplo). Para cada serie de exámenes son necesarios siete testigos:

- 1 - Antígeno sólo.
- 2 - Antígeno y complemento inactivado.
- 3 - Antígeno y complemento.
- 4 - Nichols pool, diluido al 1/x y complemento inactivo.
- 5 - Nichols pool diluido a 1/x y complemento.
- 6 - Nichols pool diluido al 1/y y complemento.
- 7 - Nichols pool diluido al 1/z y complemento.

La dilución al 1/x del N. pool debe inmovilizar al 20% de los treponemas. La dilución al 1/y al 50% y la 1/z al 80%.

El testigo 1 es el de la supervivencia y movilidad de los treponemas. Los testigos 2 y 3 permiten controlar la no sensibilidad de los treponemas a los anticuerpos de conejo y la falta de actividad del -- complemento inactivo. Finalmente, los testigos 5, 6, y 7 por comparación con el testigo 4, permiten apreciar la sensibilidad del antígeno.

Se colocan los tubos a 35°C durante 22-24 horas en la misma atmósfera exenta de O₂ que se ha empleado para la preparación del antígeno.

La lectura se efectúa al microscopio con fondo oscuro, examinando entre porta y cubre el contenido de todos los tubos. Para cada extirpación se establece el porcentaje de treponemas móviles calculado sobre, por lo menos 50 elementos.

La inmovilización específica (I.E.) viene expresada por la fórmula siguiente:

$$\% \text{ I.E.} = \frac{(\% \text{ T. móviles testigo} - \% \text{ T. no móviles reac})}{\% \text{ T. móviles testigo.}}$$

Un resultado se considera positivo, si la determinación de la movilidad muestra una diferencia de -- por lo menos 50% entre el tubo de la reacción y el tubo que contiene el complemento inactivo. Si la diferencia está comprendida entre 50 y 20% el resultado es dudoso; la reacción es negativa si la diferencia es inferior al 20%. No se pueden formular conclusiones de ninguna clase, si menos del 70% de los treponemas en el tubo que contiene el complemento inactivo permanecen móviles después de las 24 horas de incubación.

Después de la reacción debe controlarse la presencia residual del complemento libre en la serie de los tubos problema agregando a cada tubo 0,5 ml. de un sistema hemolítico previamente sensibilizado e incubado 20 minutos a 37°C, comprobándose la existencia de hemolisis en la mayoría de los tubos. En aquellos en que se observa la ausencia de hemolisis, puede no ser debido a una falta de complemento, sino tratarse de sueros tóxicos o anti-complementarios en los que algún factor interfirió la reacción de hemolisis.

La sensibilidad del Test T.P.I. es superior a la de todos los test serológicos de diagnóstico de la sífilis. Sin embargo, puede ser negativo en los casos de sífilis primaria y asimismo al inicio de algunos secundarismos, mientras que en todos los demás casos se muestra positivo.

Su especificidad se aproxima al 100 por 100.

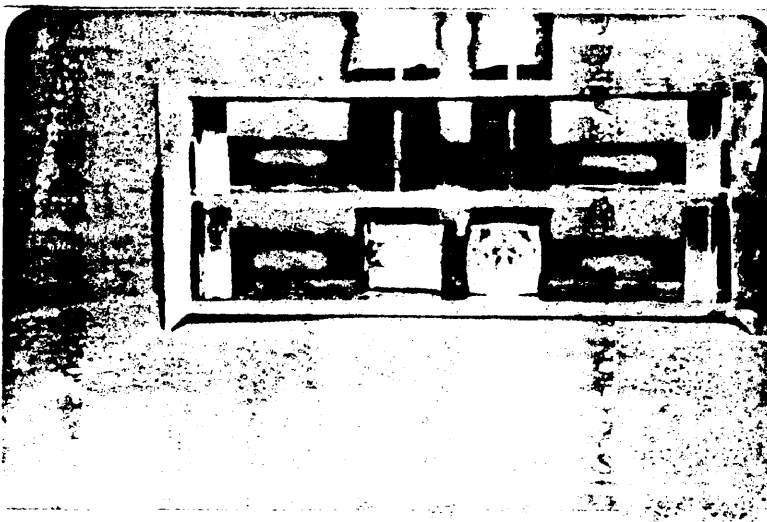
Es un test cualitativo de diagnóstico que no puede servir para la indicación del tratamiento. Resulta particularmente indicado en las manifestaciones viscerales y nerviosas susceptibles de ser sifilíticas, y en aquellas eventualidades en que la serología clásica es positiva sin que existan signos clínicos de enfermedad. Fots. 9-10-11-12-13 y 14.

6-572

T E S T D E N E L S O N



EXTRACCION DEL COMPLEMENTO Fot. 9



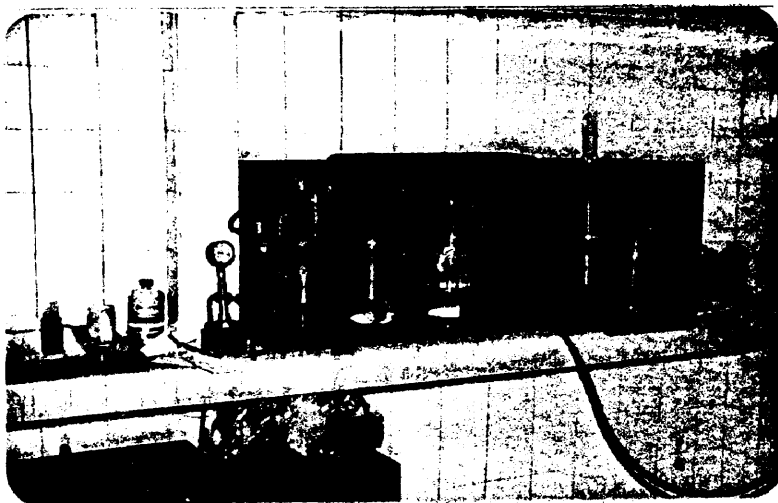
SEPARACION DEL COMPLEMENTO Fot. 10

TEST DE NELSON



Testículo de conejo desmenuzado: extracción de treponemas

Fot. 11



Mecanismo de extracción de bases

Fot. 12

6-77-6

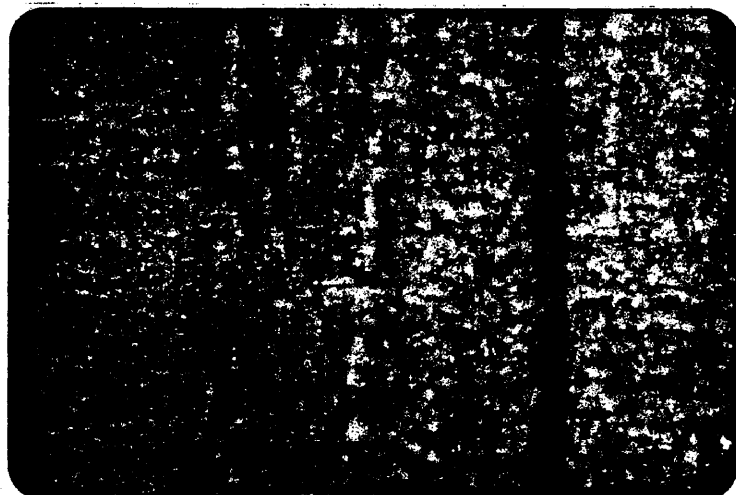
101

TEST DE NELSON



Inoculacion intratesticular de treponemas al conejo

Fot. 13



Treponemas Pallidum aumento 600 X

Fot. 14

TRANSFORMACION BLASTICA DEL LINFOCITO

Fue Nowell (1960), el que observó por primera vez en los cultivos de sangre normal, en presencia de fitohemaglutinina (F.H.A.), el desarrollo de células parecidas a las blásticas, con todas las características de células primitivas. La F.H.A. se extrae de una leguminosa (*Phaseolus vulgaris*). Se venía utilizando desde 1916, para eliminar los eritrocitos de los sueros sanguíneos por aglutinación. Posteriormente, se empleó como método de separación de leucocitos. Muchos autores, observaron la aparición de células primitivas en un cultivo de linfocitos pequeños y medianos cuando existe en el medio fitohemaglutinina CARS-TARS (1962), ELVES y WILKINSON (1963).

Más tarde se han observado otras sustancias también capaces de producir transformación blástica como son: concanavallin, fitolaca, endotoxina de la *E. coli*, filtrado de estafilococos, periodato potásico, cloruro, mercurio, etc. Pero además de todas estas sustancias que tienen carácter mitógeno, PEARMAIN, LYCETTE y FITZGERALD (1963), comunican que hay una transformación blástica de los linfocitos en presen-

cia de tuberculina P.P.D. en los casos en que los enfermos eran tuberculina positivos, pero no ocurriría otro tanto en los sujetos que eran tuberculina negativos. Desde entonces, proliferan las comunicaciones de transformación blástica de linfocitos, cuando los leucocitos está sensibilizados a un antígeno bacteriano y este está presente en el cultivo.

Fue LAZZARO y LANZA (1968), quienes lograron por primera vez la transformación blástica de los linfocitos procedentes de enfermos sífilíticos cuando se los cultivaba en presencia de treponemas patógenos muertos. LEVEN y col. encuentran en el plasma de los sífilíticos, un factor que inhibe la transformación blástica de los linfocitos; este factor puede ser suprimido cultivando sólo los linfocitos con suero fetal de ternera o suero del grupo AB.

El fenómeno de la transformación del linfocito, bien en presencia de sustancias antigénicas o de sustancias blastogénicas, trae consigo unas modificaciones apreciables como son: el aumento de volumen de la célula por aumento de todos los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y de todos los órganos celulares que intervienen en la síntesis proteica (aparato de Golgi, mito--

condrias, etc.); la aparición de grandes vacuolas; - las modificaciones metabólicas, como son: el aumento de AMP cíclico y la activación de las adenociclasas y del GMP de los lípidos y fosfolípidos.

Este proceso dará lugar a que comience a aumentar el RNA hasta que alcance un cierto nivel, entonces se sintetiza DNA y al doblarse el valor inicial, sobreviene la mitosis. Este proceso transcurre en -- unas 36 horas desde el principio de su activación, - como demuestra COOPER (1965) y SIMON (1968).

Ciertas sustancias como son los antimetabólicos, los corticoides, los salicilatos, cloranfenicol, actinomicina D, clorpromacina, cuamaina, rifampicina, tetraciclina, talidomida y hidantoina, hormonas (gonatropina, estrógenos y progesterona) etc., pueden inhibir la transformación linfoblástica por lo que los pacientes a los que se les deba hacer dicha prueba, no deben estar bajo tratamiento de estos preparados.

Para la práctica del T.T.L. lo primero que tenemos que realizar es la separación de las células sanguíneas productoras del factor mitogénico, en este - caso los linfocitos.

Hay diferentes procedimientos para una buena se

paración de las células sanguíneas, pero los que dan más rendimiento en linfocitos, son los basados en -- una separación de gradientes de densidad A. BOYUUM - (1968) y THORBY (1970). Para niños recién nacidos empleamos una microtécnica: Carr (1972) y Ruiz Requena (1977).

En el comercio existen preparados con súficiente garantía que siguen estos principios como - el LYMPHOPREP (mezcla de Ficoll y Metrizoato sódico), con una densidad final de 1.077 0,001 gr/ml.

TECNICA

Se extraen 40 ml. de sangre con heparina libre de conservador, y se deposita cuidadosamente sobre la solución Ficoll; acto seguido se lleva a la centrífuga a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos. Obtendremos una serie de capas que de arriba a abajo serán: plasma, - anillo de células mononucleares, solución de Ficoll, - eritrocitos y granulocitos.

Con pipeta Pasteur se recoge el anillo de células mononucleadas, compuesto de linfocitos y monocitos y lo sometemos a tres lavados con solución de --- Hanks.

Preparamos una solución de leucocitos de 0,75 a 1×10^6 por ml. en medio 199 con dos gotas de heparina.

Se hacen dos series por enfermo. La primera serie servirá de testigo y contendrá la suspensión de los linfocitos en el medio de cultivo. A la segunda, además de la suspensión de linfocitos en medio de -- cultivo, se añade el antígeno sifilítico. El antígeno que empleamos está formado por una suspensión de treponemas de 1 a 4×10^4 en solución salina y congelados. Dicha suspensión antes de usarla, se deja de 15 a 20 días en el congelador para su maduración.

Consideramos que todas las técnicas emplean excesivo número de treponemas, dando lugar a una tolerancia antigénica responsable de la falta de respuesta de la transformación blástica de los linfocitos -- que tienen lugar sobre todo en la sífilis primaria y principios de la secundaria.

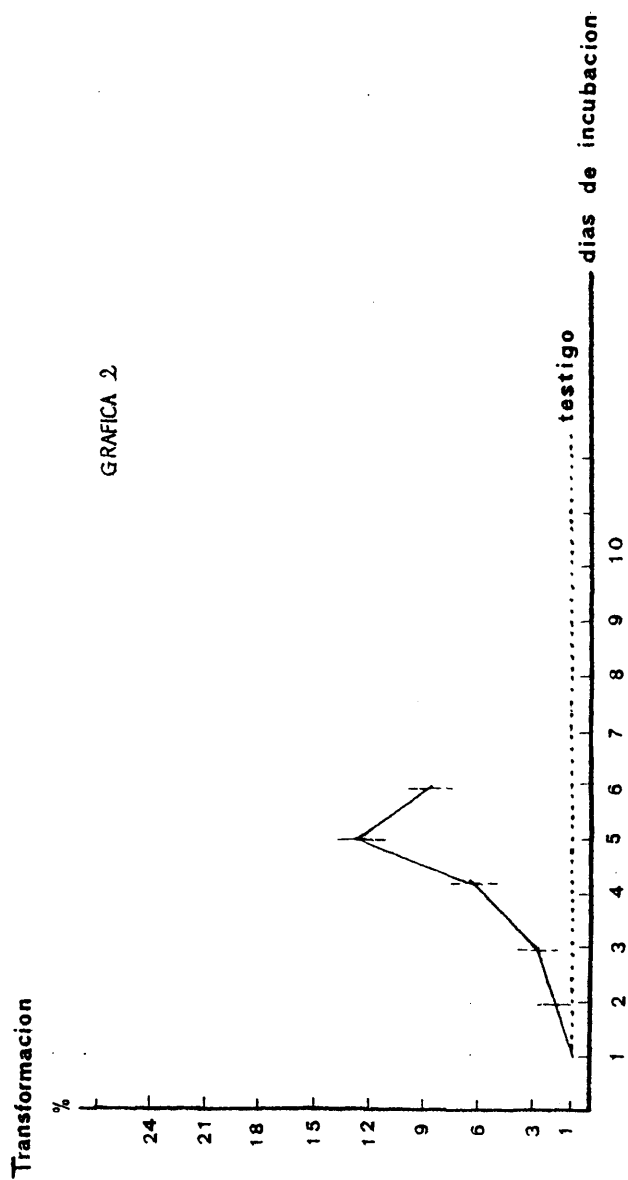
Hemos determinado previamente el tiempo óptimo de incubación del cultivo; para ello se efectuaron -- 5 cultivos de enfermos sifilíticos antiguos con pruebas reagínicas y treponémicas muy positivas, con las mismas poblaciones linfocitarias e idéntico lote de

antígeno, analizando los resultados a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas como se puede apreciar en la gráfica nº 2. En las primeras 72 horas no se observa -- una evidente transformación linfocitaria. A las 96 - horas de incubación, la transformación comienza a ser manifiesta, para alcanzar el máximo a las 120 horas, volviendo a disminuir a las 144 horas.

El tiempo de incubación elegido a la vista de - los resultados, ha sido de cinco días.

Después de estos cinco días, pasamos a la lectura de los resultados que se puede determinar bien -- por medios opticos normales, fluorescentes, o por un contador de centelleo beta. Nosotros hemos seguido - el método fluorescente con Naranja Acridina, cuyas - propiedades nos han parecido las más adecuadas para adaptarlas a nuestros medios.

En la célula viva, el Naranja Acridina se une a un pequeño número de sitios de enlace de los complejos ácido nucleicoproteína (DNA) tanto del citoplasma como del núcleo y origina una fluorescencia ortocromática de color verde; pero al comenzar a sufrir la célula (aislamiento, falta de ambiente adecuado, etc.), los complejos citados comienzan a disociarse,



GRAFICA 2

por tanto, surgen nuevos lugares independientes para el colorante, lo que aumenta su fluorescencia ortocromática en verde. Por otra parte, el RNA a poco que se desnaturalice, inmediatamente presenta más zonas de enlace libres, o sea, su coeficiente de combinación aumenta, y fija más moléculas de Naranja Acridina tiñéndose metacromáticamente en rojo.

Posiblemente el complejo RNA, rojo fluorescente abarca los fosfatos y bases de cada unidad nucleotida a lo largo del polimero, en tanto que el complejo con DNA, verde, afecta sólo al grupo fosfato terminal del polimero.

El método según BERTALAUFFI y col. es el que exponemos a continuación:

- 1º.- Separados los linfocitos del medio de cultivo por centrifugación y después de tres lavados con solución CARNOY (ácido acético + metanol), se hacen las extensiones sobre --portas frios, se deja secar y se deshidratan con alcohol-eter durante quince minutos
- 2º.- Rehidratación: con solución de alcoholes de concentración decreciente, 80º, 70º, 50º y

agua destilada durante un tiempo de diez mi
nutos en total.

3º.- Acidificación con una solución de ácido acé-
tico al 1% durante diez a quince segundos.

4º.- Dos lavados con agua destilada durante diez
segundos.

5º.- Tinción con Naranja de Acridina al 0,01% en
solución tampon de fosfatos 0,67 molar de -
pH = 6,1 durante tres minutos.

6º.- Lavado con solución tampon de fosfatos.

7º.- Diferenciación con cloruro de calcio, treⁱⁿ
ta segundos.

8º.- Montar con tampon bajo cubre-objetos y acto
seguido examinar con microscopio de fluores-
cencia, haciendo el recuento del tanto por
ciento de los blastos, en un mínimo de qui-
nientas células.

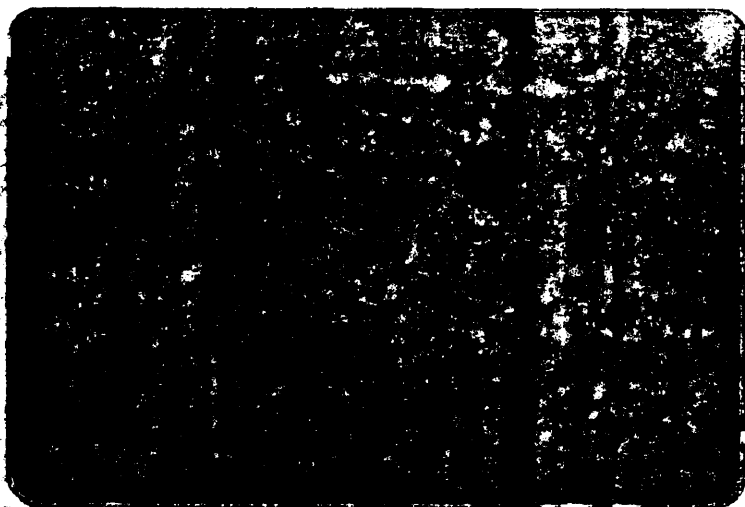
Consideramos positiva la reacción cuando --
apreciamos más de tres blastos por ciento, en el tubo
problema. Fots. nº 15 y 16.

111
T. T. L.



FRANCO LANTO: VINTATA POSITIVA (1600 X)

Fot. 15



FRANCO LANTO: VINTATA POSITIVA (1600 X)

Fot. 16



SECRETARIA

RESULTADOS

Se han realizado las siguientes pruebas serológicas e inmunológicas: (V.D.R.L.; F.T.A. Abs. en sus dos modalidades (IgM e IgG); Test de Inmovilización de Treponemas y T.T.L.) a los sueros procedentes de los enfermos anteriormente citados, obteniendo los resultados que insertan los cuadros 1 al 5.

Los cuadros están compuestos por dos partes: la parte superior expresa los resultados encontrados a esos sueros con las técnicas empleadas, mientras que en la parte inferior, estos mismos resultados, están representados porcentualmente.

Nos ha parecido conveniente separar en apartados diferentes a los sueros procedentes de pacientes que no han recibido tratamiento, de los que han gozado de este beneficio. Se les ha hecho a estos últimos pacientes, controles serológicos en tres períodos de tiempo, entre los tres, doce o más meses a constatar

			R E S U L T A D O S									
nº sueros	tratamiento	inicio tratamiento	VDRL		TPI		IgG		IgM		TTL	
			N - P		N - P		N - P		N - P		N - P	
10 sueros de 10 enfermos	NO		8 - 2		10 - 0		7 - 3		3 - 7		2 - 8	
24 sueros de 10 enfermos	SI	0 - 3 meses	8 - 2		10 - 0		7 - 3		4 - 6		3 - 7	
		3-12 meses	9 - 1		10 - 0		7 - 3		10 - 0		6 - 4	
		> 12 meses	4 - 0		4 - 0		3 - 1		4 - 0		3 - 1	

			I N D I C E D E P O S I T I V I D A D									
nº sueros	tratamiento	inicio tratamiento	VDRL		TPI		IgG		IgM		TTL	
10 sueros de 10 enfermos	NO		20%		0%		30%		70%		80%	
24 sueros de 10 enfermos	SI	0 - 3 meses	20%		0%		30%		60%		70%	
		3-12 meses	10%		0%		30%		0%		60%	
		> 12 meses	0%		0%		25%		0%		25%	

SIFILIS PRIMARIA

cuadro 1

		R E S U L T A D O S										
nº sueros	tratamiento	inicio tratamiento	VDRL		TPI		IgG		IgM		TTL	
			N - P		N - P		N - P		N - P		N - P	
9 sueros de 9 enfermos	NO		0 - 9		2 - 7		0 - 9		1 - 8		0 - 9	
32 sueros de 13 enfermos	SI	0 - 3 meses	1 - 8		3 - 6		0 - 9		2 - 7		0 - 9	
		3 - 12 meses	6 - 5		4 - 7		0 - 11		8 - 3		0 - 11	
		> 12 meses	8 - 4		5 - 7		2 - 10		12 - 0		0 - 12	

		inicio tratamiento	I N D I C E D E P O S I T I V I D A D										
nº sueros	tratamiento		VDRL		TPI		IgG		IgM		TTL		
9 sueros de 9 enfermos	NO		100 %		77 %		100 %		88 %		100 %		
32 sueros de 13 enfermos	SI	0 - 3 meses	88 %		66 %		100 %		77 %		100 %		
		3 - 12 meses	45 %		63 %		100 %		25 %		100 %		
		> 12 meses	33 %		58 %		83 %		0 %		100 %		

114

R E S U L T A D O S												
nº sueros	tratamiento	inicio tratamiento	VDRL		TPI		IgG		IgM		TTL	
			N - P		N - P		N - P		N - P		N - P	
52 sueros de 52 enfermos	NO		1 - 51		0 - 52		0 - 52		19 - 33		0 - 52	
149 sueros de 133 enfermos	SI	0 - 3 meses 3 - 12 meses > 12 meses	1 - 41 2 - 47 3 - 55		1 - 41 1 - 48 2 - 56		0 - 42 0 - 49 1 - 57		19 - 23 41 - 8 53 - 5		0 - 42 0 - 49 0 - 47	

I N D I C E D E P O S I T I V I D A D												
nº sueros	tratamiento	inicio tratamiento	VDRL		TPI		IgG		IgM		TTL	
			N - P		N - P		N - P		N - P		N - P	
52 sueros de 52 enfermos	NO		98 %		100 %		100 %		63 %		100 %	
149 sueros de 133 enfermos	SI	0 - 3 meses 3 - 12 meses > 12 meses	97 % 95 % 94 %		97 % 97 % 96 %		100 % 100 % 100 %		54 % 16 % 8 %		100 % 100 % 100 %	

SIFILIS TERCIARIA

cuadro 3

nº sueros de	tratamiento	inicio tratamiento	R E S U L T A D O S							
			VDRL	TPI		IgG		IgM		TTL
				N - P	N - P	N - P	N - P	N - P	N - P	
12 sueros de 12 enfermos	NO		N - P 0 - 12	N - P 0 - 12	N - P 0 - 12	N - P 0 - 12	N - P 2 - 10	N - P 0 - 12		
57 sueros de 57 enfermos	SI	0 - 3 meses 3 - 12 meses > 12 meses	1 - 21 1 - 20 1 - 13	0 - 22 0 - 21 0 - 14	0 - 22 0 - 21 0 - 14	0 - 22 0 - 21 0 - 14	4 - 18 12 - 9 13 - 1	0 - 22 0 - 21 0 - 14		

nº sueros de	tratamiento	inicio tratamiento	I N D I C E D E P O S I T I V I D A D				
			VDRL	TPI	IgG	IgM	
							TTL
12 sueros de 12 enfermos	NO		100%	100%	100%	93%	100%
57 sueros de 23 enfermos	SI	0 - 3 meses 3 - 12 meses > 12 meses	95% 95% 95%	100% 100% 100%	100% 100% 100%	83% 42% 7%	100% 100% 100%

SIFILIS LATENTE

cuadro 4

RESULTADOS

inicio tratamiento			R E S U L T A D O S							
nº sueros	tratamiento		VDRL	TPI		IgG		IgM		TTL
				N - P	N - P	N - P	N - P	N - P	N - P	
8 sueros de	NO									
8 enfermos			0 - 8	0 - 8	0 - 8	0 - 8	1 - 7	2 - 6		
20 sueros de	SI	0 - 3 meses	0 - 8	0 - 8	0 - 8	0 - 8	2 - 6	1 - 3		
8 enfermos		3 - 12 meses	3 - 5	1 - 7	1 - 7	1 - 7	5 - 3	1 - 3		
		> 12 meses	3 - 1	1 - 3	1 - 3	1 - 3	4 - 0	1 - 3		

inicio tratamiento			I N D I C E D E P O S I T I V I D A D							
nº sueros	tratamiento		VDRL	TPI		IgG		IgM		TTL
				N - P	N - P	N - P	N - P	N - P	N - P	
8 sueros de	NO									
8 enfermos			100%	100%	100%	100%	87%	75%		
20 sueros de	SI	0 - 3 meses	100%	100%	100%	100%	75%	75%		
8 enfermos		3 - 12 meses	37%	87%	87%	87%	37%	75%		
		> 12 meses	25%	75%	75%	75%	0%	75%		

SIFILIS CONGENITA

cuadro 5

desde el momento de iniciarse el tratamiento, siguiendo las recomendaciones elaboradas por el Comité de Expertos de Enfermedades Venéreas de la O.M.S., en el Congreso Hispanoamericano celebrado en Argentina --- (1975).

Con el fin de obtener mayor claridad, hemos llevado a cabo la representación gráfica de los porcentajes de positividad a cada respuesta y en cada estadio de la sífilis, gráficas de 3 a 7 ambas inclusive; la gráfica nº 8 es común para todos los períodos de la enfermedad antes de haber recibido tratamiento.

A continuación, comentaremos brevemente los datos que se pueden obtener de la observación de cada una de las gráficas.

GRAFICA nº 3 - Las curvas que aparecen en esta gráfica reflejan la marcha de los anticuerpos correspondientes al 2º, 3º, y 4º control de los enfermos de sífilis primaria tratados. El punto cero, el de iniciación de las diferentes curvas que componen la gráfica, es el correspondiente al índice de positividad encontradas en el momento de poner el tratamiento, para de esta forma poder apreciar con claridad las modificaciones acaecidas con cada reacción en los con---

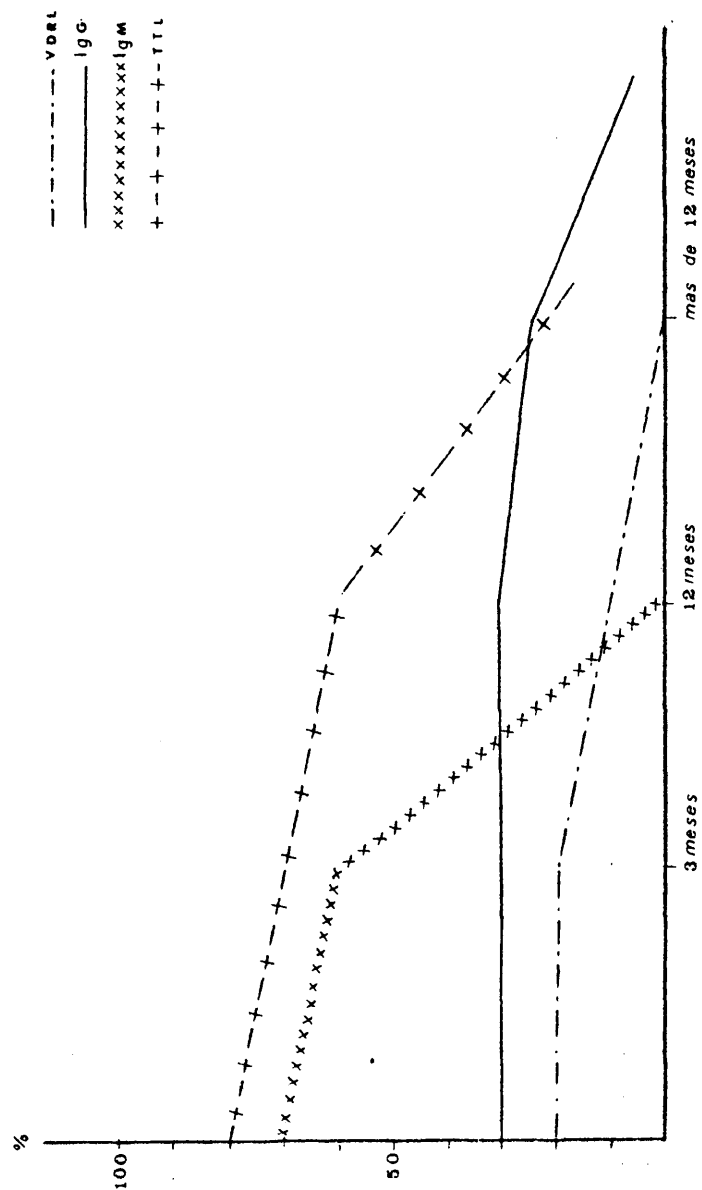
troles practicados, a los 3, 12 o más meses desde el comienzo de la actuación terapéutica.

Se observa diferente comportamiento en los niveles de los distintos anticuerpos: las Inmunoglobulinas M, globulinas que han alcanzado un grado de positividad, comienzan a descender lentamente hasta los tres meses, para a partir de dicha fecha marcarse un violento descenso, que finaliza en el punto cero antes de llegar a los 12 meses.

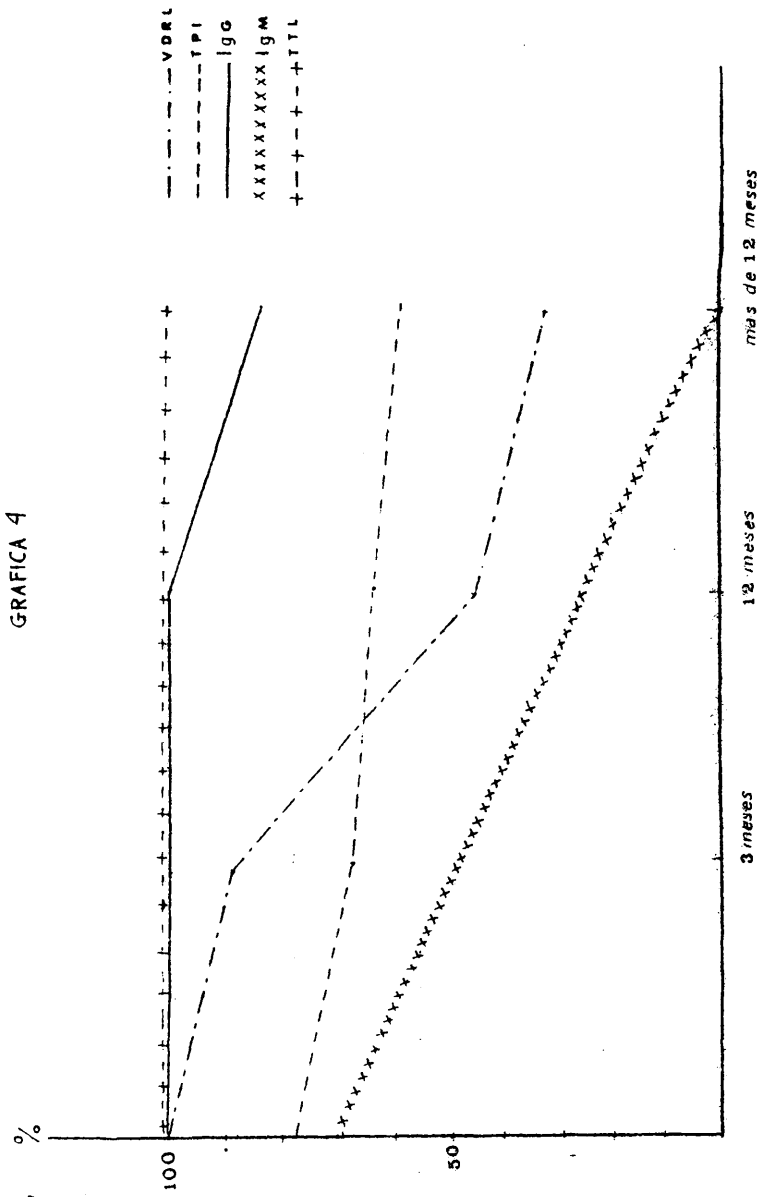
Las reaginas, también sufren la misma suerte que los IgM, sin embargo, la desaparición de dichos anticuerpos de una manera definitiva, sólo ocurre en un tiempo más tardío.

Las inmunoglobulinas G, difieren del resto de los anticuerpos descritos anteriormente. No podemos apreciar un descenso marcado de la positividad que poseíamos en un principio, aún en los controles más alejados de la fecha de iniciación terapéutica, pero eso sí, cuando practicamos diluciones para cuantificar el título de estos sueros, nunca nos encontramos con cotas más altas de anticuarpos del 1/50.

GRAFICA 3

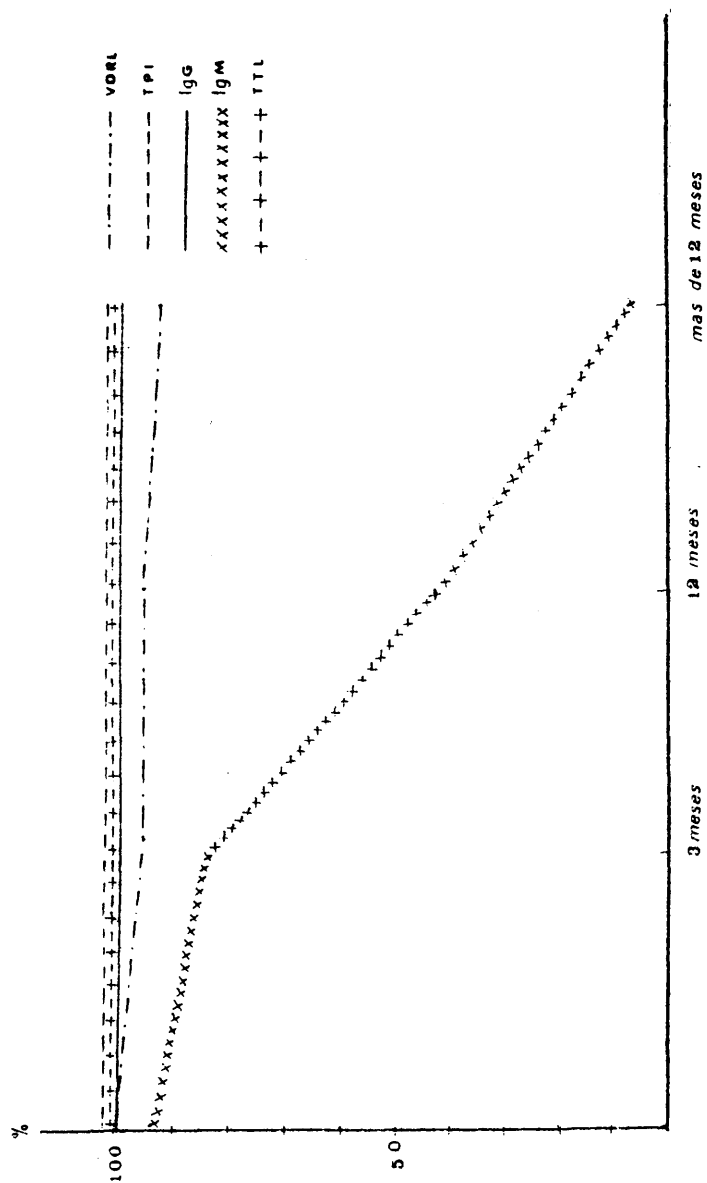


SIFILIS PRIMARIA TRATADA



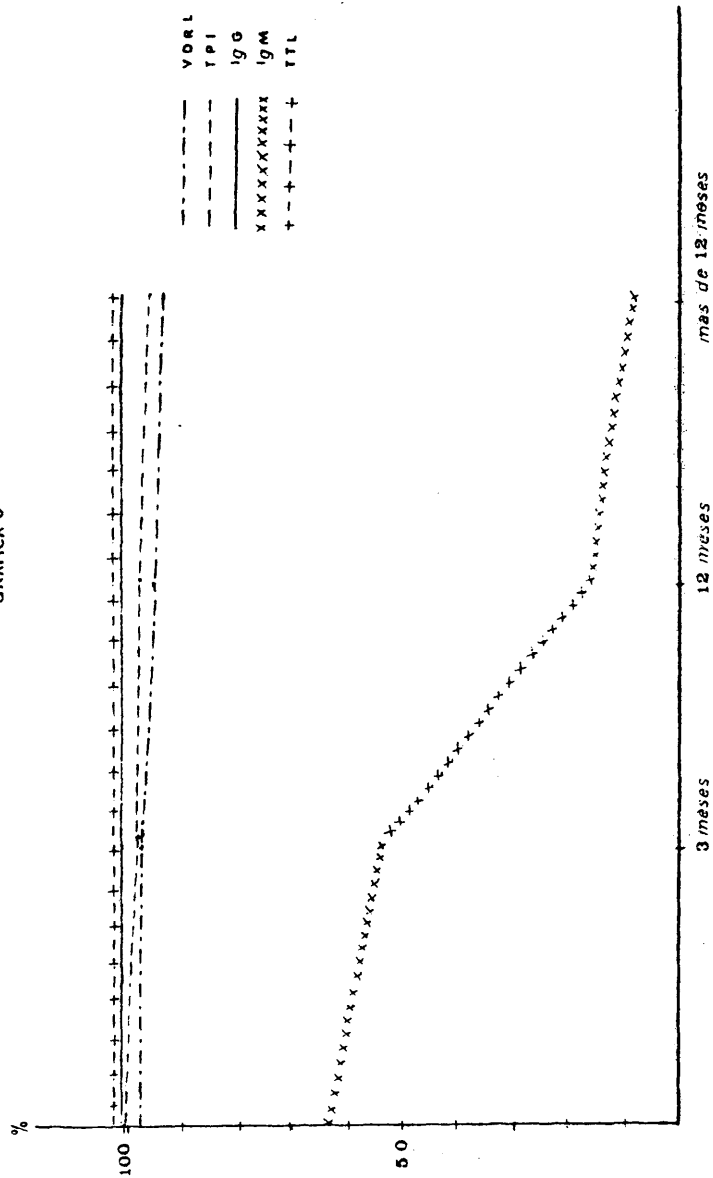
SIFILIS SECUNDARIA TRATADA

GRAFICA 5

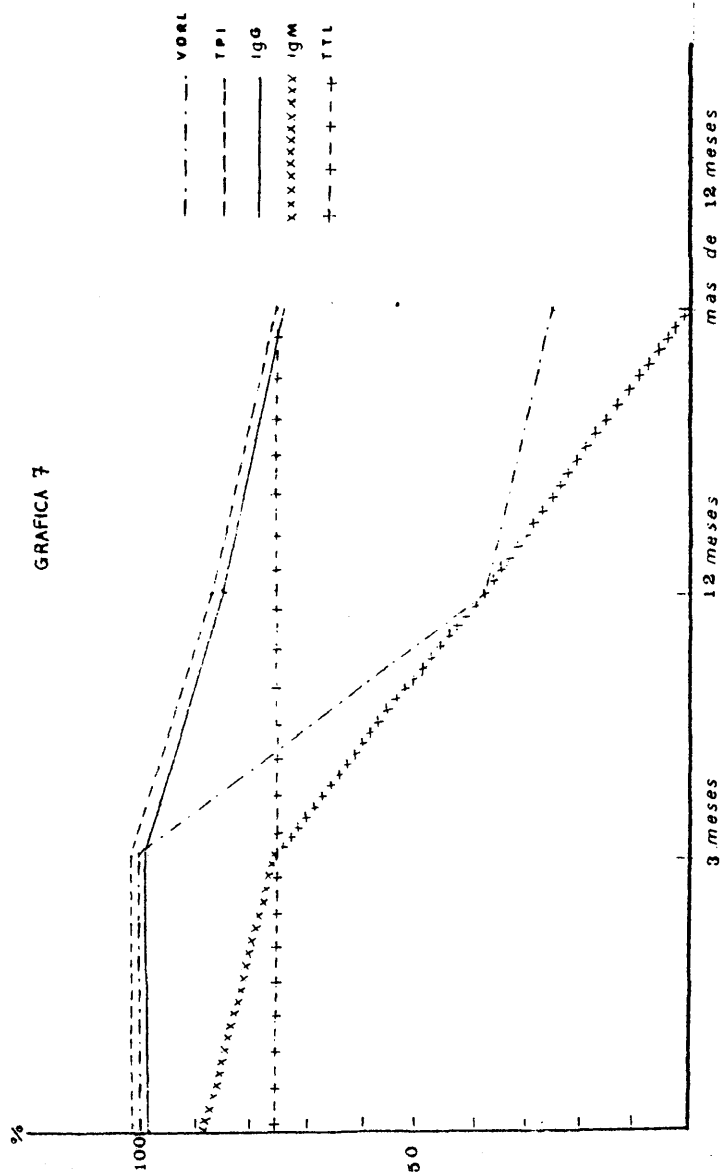


SIFILIS TERCIARIA TRATADA

GRAFICA 6

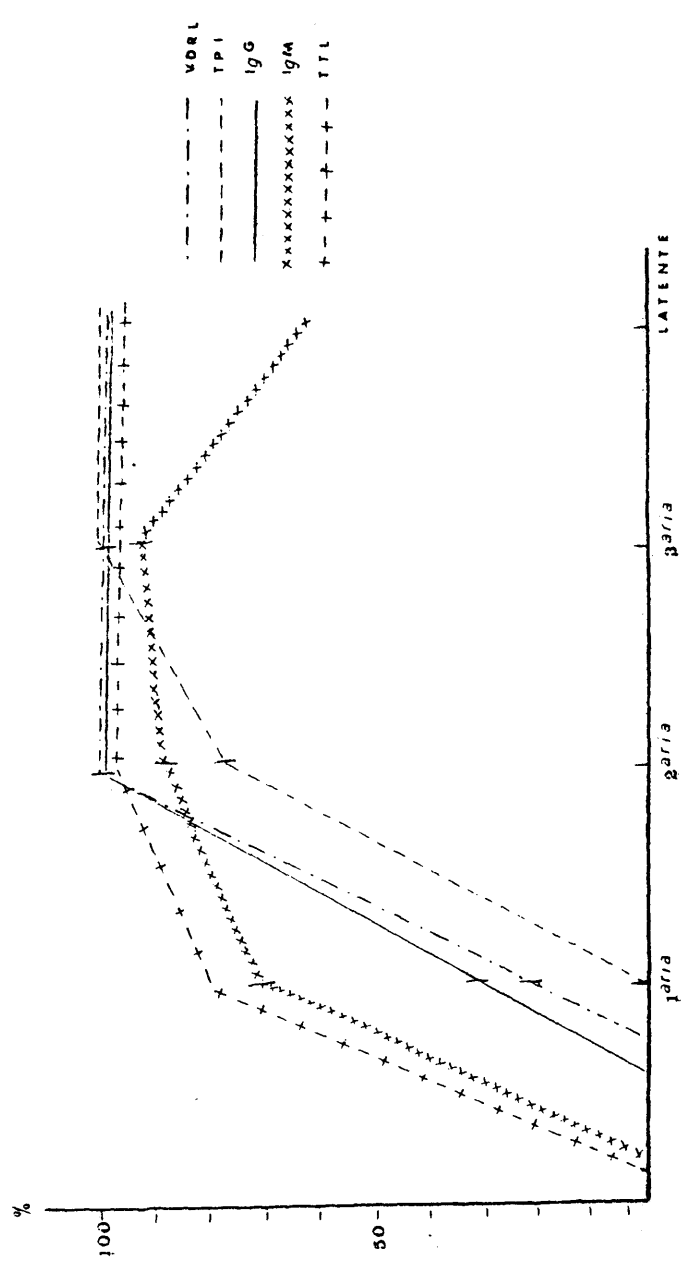


SIFILIS LATENTE TRATADA



SIFILIS CONGENITA

GRAFICA 8



EVOLUCION INMUNOLOGICA EN LA SIFILIS NO TRATADA

Las inmovilisininas, son anticuerpos que aún no han hecho acto de presencia en este estadio de la sífilis, por lo cual no tienen sitio en esta representación gráfica.

La inmunidad celular, prueba que en este estadio de sífilis primaria nos marca la primicia de la enfermedad, también nos marca los niveles más altos de positividad; la negativización del T.T.L. (prueba escogida de la representación de la inmunidad celular) es muy difícil, y cuando por fin acontece apreciamos que en dichos sueros no hay representación positiva de ninguna otra prueba.

GRAFICA nº 4 - Refleja los niveles alcanzados por los anticuerpos de sífilis secundaria tratada. También hemos escogido como punto cero, el índice de positividad alcanzado antes del tratamiento. Observamos que es tán presentes todos los anticuerpos, con niveles altos tanto en índices de positividad como en cantidad de tí tulo de dilución.

En cuanto a la eliminación de los anticuerpos hay discretas diferencias; el T.T.L. que en esta fase ha alcanzado su curva máxima del 100% de positividad, per manece inalterable durante toda la vida, aún con trata

mientos intensivos.

Las inmovilisininas y las IgG, practicamente no va rían durante muchos años, solamente después de tratamientos intensivos y repetidos se logra que estas cifras descieran en algo menos de 20% (19 para las inmovilisininas, 17 para las inmunoglobulinas IgG).

También en este período de la sífilis se logra -- una negativización de las IgM y de las reaginas, pero ocurre en un tiempo más largo que en la primaria. Las IgM pasados los 12 meses mientras las reaginas necesitan por lo menos dos años.

GRAFICA nº 5 - Es la gráfica que está compuesta por las curvas correspondientes a las medidas efectuadas en la sífilis terciaria tratada, con las diferentes reacciones analíticas empleadas. Como es lógico, ya ha transcurrido un tiempo suficientemente alejado desde el contagio de la infección para tener todas -- las reacciones inmunológicas positivas, tanto de la inmunidad celular como de la humoral y las curvas representativas de cada reacción serán muy semejantes sobre todo en lo que respecta al punto cero o de iniciación; esto ocurre así con las reaginas, las IgG, las inmovilisininas, T.T.L. y también las IgM pero com

un 10% más bajo, este mismo fenómeno ocurre en el momento de desaparición pues son las IgM las únicas que tienen el descenso significativo, en un tiempo algo mayor de 12 meses.

Las IgG al iniciarse el tratamiento generalmente rebasaban el título de 1/10.000 para decender a los 12 meses muy cerca de 1/100 quedándose debajo de 1/50 cuando ya han superado los dos años de haber seguido el tratamiento correcto.

También hay disminución en el título de los anticuerpos medidos por V.D.R.L., aunque no, en el tanto por ciento de sueros positivos, en un tiempo menor de 2 años de tratamiento intensivo. El título de dilución en este control último no suele bajar de 1/8 o a lo sumo 1/4.

El Test de Nelson y el T.T.L. no sufren ninguna modificación en cuanto a positividad; la mecánica de la reacción, nos impide poder dar los resultados a niveles de diluciones, no pudiendo apreciarse la disminución cuantitativa de los anticuerpos representados por esta reacción.

GRAFICA nº 6 - Esta formada por los parámetros - encontrados con las diferentes reacciones en los enfermos de sífilis latente tratada, es decir, aquellos sujetos cuya única manifestación de enfermedad sifilítica, es la presencia de reacciones reagínicas y treponémicas positivas sin síntomas clínicos manifiestos.

Pocas diferencias se observan entre las distintas curvas que forman la gráfica, todas ellas se podrían representar por una línea común, excepto en lo tocante a la curva de las IgM que además de ser menor que todas las demás también alcanza un grado más bajo que en la sífilis terciaria, para igualarse al final del cuarto control.

Los títulos de los anticuerpos V.D.R.L. y P.T.A. Abs. IgG son más bien bajos y suelen estar al comienzo del tratamiento en lo que respecta al V.D.R.L. al $1/8$ para descender al $1/2$ cuando ha pasado más de dos años del comienzo del tratamiento. Los títulos de los anticuerpos IgG empiezan por títulos más bajos de $1/5.000$ para estabilizarse en el tiempo entre $1/100$ y $1/50$.

GRAFICA nº 7 - Las curvas que forman esta --

gráfica reflejan las diferentes respuestas inmunológicas acontecidas en los enfermos con sífilis congénita.

El punto inicial de cada curva, está situado en el eje de las ordenadas y representa el índice porcentual de positividades obtenido en el mismo momento o unos días después del nacimiento del posible enfermo sífilítico. Los sucesivos puntos que conforman la curva son los índices de positividades obtenidos sistemáticamente en los controles acaecidos a los 3, 12 y -- más meses transcurridos desde la primera determinación y con el comienzo del tratamiento.

De todas las curvas la que inicialmente da menos respuestas positivas es la gráfica que viene representando a la inmunidad celular, curva plana que no se modifica, en los controles sucesivos después del tratamiento, posiblemente será positiva durante toda la vida del paciente.

La curva que traduce los anticuerpos IgM adquiere un máximo del 87% de positividades en el momento del nacimiento, para desde este parámetro descender paulatinamente, hasta negativizarse, nunca antes de los 12 meses de haber iniciado el tratamiento. La falta de -

respuesta de los anticuerpos IgM en el 13% de los casos, en comparación con las otras reacciones, nos indica, bien que el enfermo no estaba infectado de sífilis o que por el contrario, que pudiendo tener la infección, estos anticuerpos permaneciesen bloqueados - por el exceso de anticuerpos IgG procedentes de diferentes lugares, IgG maternos, o IgG fabricado por el propio sujeto. En nuestra casuística, este 13% de sujetos negativos pertenecen a sujetos sin síntomas clínicos de enfermedad. En revisiones posteriores a los 16 meses desde el primer control y sin tratamiento, seguían sin manifestar ningún signo de una posible enfermedad, y con descenso de los títulos detectados por las pruebas reaginíticas y treponémicas IgG, lo cual nos confirmó a posteriori que dichos anticuerpos eran de transmisión materna.

Las pruebas serológicas detectadas por el V.D.R.L. tienen un alto porcentaje de positividad en los tres primeros meses, pero desde este momento sufren una progresiva caída hasta los 12 meses; tiempo que marca una barrera, pues los sueros que aún permanecen positivos ya les será muy difícil negativizarse, siendo esta positividad persistente a escaso título, estando entre -

1/4 - 1/2 e incluso en suero puro.

Las curvas representativas de las inmovilisinias y de las inmunoglobulinas IgG, corren paralelas, teniendo un pequeño declive hacia los tres meses, coincidiendo entonces con las curvas de la IgG e IgM, haciéndonos sospechar que esta mella está producida más que por el éxito de la actuación terapéutica por la eliminación de los anticuerpos maternos transmitidos por vía trasplacentaria.

Los casos que son reactivos a partir de esa fecha, permanecerán positivos gracias a los anticuerpos fabricados por el propio organismo, con la persistencia durante toda la vida a títulos pequeños.

GRAFICA nº 8 - Refleja la respuesta inmunológica del enfermo sifilítico no sometido a tratamiento, tanto en la vertiente de respuesta celular como humoral y dentro de esta última, la respuesta inespecífica a la cardiolipina y la específica antitreponémica por medio de los anticuerpos inmovilizantes e inmunofluorescentes. IgG e IgM.

Para la construcción de las distintas curvas -- que componen esta gráfica hemos variado la línea seguida hasta ahora, ya que tratamos que sean realiza--

dos otros caracteres que con las anteriores directrices nos sería imposible de determinar. Para ello hemos tomado en el eje de las ordenadas los mismos tantos por cientos de positividades de los sueros de los enfermos hallados con las diferentes pruebas. En el eje de abscisas se han determinado como puntos de referencia el período clínico en que se descubrió la enfermedad cuando aún no había recibido tratamiento.

Los beneficios que nos reporta esta forma de determinar las diferentes curvas de los anticuerpos son múltiples; por un lado apreciamos cuales son los primeros anticuerpos en aparecer, su evolución y hasta su eliminación, por otro, cuales y cuanto tiempo pueden persistir después de la curación.

La primera respuesta que aparece es la concerniente a la inmunidad celular, puesta de manifiesto a través de la transformación blástica de los linfocitos. Alcanza su cenit en los primeros momentos de la enfermedad, coincidiendo con la aparición del chancro, o algunos días antes. Se mantiene reactiva durante toda la vida del sujeto, aunque se consiga yugular la enfermedad en sus primeros estadios.

Esta respuesta de la inmunidad celular ha dado -

resultados similares cuando se han empleado otras técnicas diferentes a la de la transformación blástica, - como son la inhibición de migración de macrófagos o - de leucocitos SCHELL MUSHOY (1975).

Observamos que durante toda la evolución de la enfermedad sifilítica no tratada, existe un paralelismo entre la I.C. y las pruebas clásicas.

Los anticuerpos que primeramente se detectan en - cuanto a la Inmunidad Humoral, son los anticuerpos inmunofluorescentes IgM.

Esta curva sigue la regla general de cualquier infección como lo prueba los trabajos que comenzara ---- D'ALESSANDRO y col. y fueron seguidos por MERK, LEN, - BUZACOUX y POTIER (1968); LUIRALY, BAC KHAUSZ, CLOBAGY LAJOS (1968); MANIKOWS-LESIINSKA y JAKUBOWSK (1969); - MILLER y col. (1969); ACKERMAN y col. (1969). Manual de Test para Sifilis. Departamento de la Salud E.E.U.U (1969). MANUNES y col. (1970), SEPTEJIAN y col. (1970), KIPNIS (1971) y JHONSTON (1972), etc.

La curva alcanza su máximo en la sífilis primaria comenzando a descender paralelamente en la secundaria sin llegar a desaparecer en el resto de los estadios - de la sífilis.

Los títulos alcanzados por esta globulina nunca - han sido muy elevados. Las diluciones mayores de 1/45 han sido raras y cuando las hemos conseguido casi siempre ha sido en la fase de adenitis manifiesta.

Muchas veces la IgM ha ido disminuyendo lentamente hasta incluso no ser detectada por esta metódica, - pero si previamente se ha separado de los sueros sifilíticos la fracción IgM por cromatografía y se ha hecho la prueba sobre este producto, veremos que entonces sí es positiva. MULLER y LOA (1974).

Estas IgM que al comienzo son poco numerosas pero muy potentes para mostrar su conjunción inmunofluorescente, entraran en competencia con las otras globulinas que sucesivamente van apareciendo hasta que consiguen bloquear los demás determinantes antigénicos de los treponemas.

Más tarde en el tiempo aparecen las IgG, puestas en evidencia por la inmunoglobulina fluoresceinada anti-IgG (MICOL, 1966; ROUQUES, 1966-67). Estos anticuerpos permanecen altos en todos los estadios de la sífilis. Las diluciones máximas de los sueros positivos -- suelen alcanzarse una semana después de la aparición - de la adenitis concomitante al chancro de inoculación,

pudiendo llegar hasta una dilución del suero 1/100.000

Las reaginas, anticuerpos cuya aparición tiene lugar una semana después de manifestarse el chancro, son muy de tener en cuenta; gracias a ellas podemos contar con un puntal importante para seguir el tratamiento, pudiendo alcanzar hasta un máximo de dilución del suero de 1/256.

Los últimos anticuerpos detectados entre el final de la primaria y, poco antes de comenzar la secundaria son los anticuerpos inmovilizantes puestos en evidencia por el Test de Nelson.

Podemos apreciar en la gráfica que el porcentaje de positividad de todos los anticuerpos ha alcanzado su cenit en el período secundario, para a partir de aquí persistir en un mismo nivel durante toda la evolución de la enfermedad excepto los anticuerpos IgM que descienden paulatinamente e incluso llegan hasta negativizarse. El título de los anticuerpos, aunque también adquiere su máximo en todas las reacciones en el período secundario de la enfermedad, desciende paulatinamente sin llegar a negativizarse, excepto el de las IgM.

CRITERIOS DE CURACION

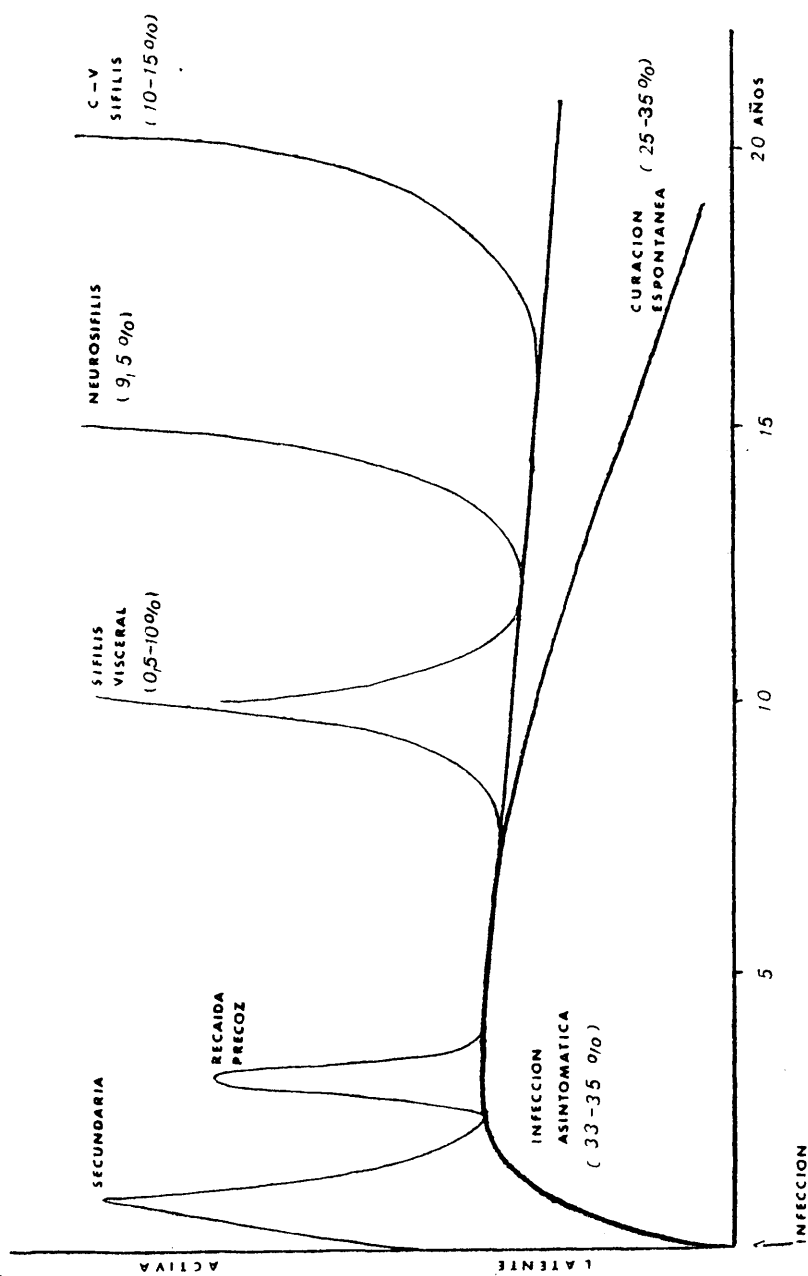
Con la introducción de la penicilina por LAURCE y COLLIER en 1943 en el arsenal terapéutico de la espiroquetosis experimental y la demostración por MAHOMMEY, HARRIS y ARNOLDI (1943) de su acción trepanocida, en la sífilis primaria seropositiva se pensó en la erradicación de la enfermedad, esperanza que fue corroborada por el descenso tan espectacular observado en todos los países del mundo entre los años 1956 al -- 1958. A partir de las fechas anteriores en la mayoría de las naciones, entre ellas la nuestra, se manifestó un recrudecimiento. Parece que en nuestro caso, se está alcanzando en la actualidad una incidencia casi igual a la del período inmediatamente posterior a la guerra. RIDET y col. (1967); GAY PRIETO -- (1969); CRONICAS DE LA OMS (1964, 1965, 1969, 1974, -- 1975, 1976, 1977); INFORMES ANUALES DE LA DIRECCION

ANUAL DEL DIRECTOR GENERAL DE LA OMS (1974, 1976); RIVERO GAZOL (1977, 1978); PINO CORRAL (1978).

Que la sífilis es una enfermedad, a pesar de su - epidemiología, curable, incluso en muchos casos espontáneamente, está admitido por todas las personalidades que se dedican al estudio de las trepanomatosis, opinión avalada además por gran número de trabajos experimentales tanto en animales, HOLLANDER, TURNER (1954), - CLAK y YOBS (1968), WILKINSON (1969), como en seres humanos, MAGNUSON (1956); GJESTLAND (1965); IDSOEO y WILLCOX (1972).

La excelente ilustración de la figura nº 9 preparada por MORGAN, nos revela el curso evolutivo que sigue la enfermedad sifilítica y nos pone de manifiesto el gran número de enfermos que se curan espontáneamente.

Hoy en día se admiten distintos criterios de curación siguiendo el pensamiento de WILLCOX (1964), que - hace una serie de distinciones entre "curación clínica", desaparición de todos los síntomas clínicos; "curación serológica", negativización permanente de las reacciones serológicas; y "curación biológica", desaparición definitiva de los treponemas.



EVOLUCION NATURAL DE LA SIFILIS NO TRATADA

La curación biológica es la única que nos podría garantizar la completa curación, pero tenemos que tener en cuenta que al no disponer de ninguna prueba es pecífica que nos permita demostrar la desaparición -- completa de los treponemas del enfermo después del -- tratamiento, tendremos que hacer la evaluación por otros medios menos exactos como son: la observación -- clínica y los análisis serológicos e inmunológicos re petidos.

La experiencia ha demostrado que la curación clí nica y serológica del 100% de los casos, sólo se consigue en la sífilis temprana y creemos que probable-- mente la acompaña la curación biológica. Si las prue bas serológicas persisten en su negatividad después -- de los seis meses de terminado el tratamiento, las re caídas son excepcionales. Hay que tener en cuenta que si se demora el comienzo del tratamiento, aún sin haber llegado a un secundarismo, nos encontraremos con -- que la curación serológica de todos los casos y con -- más razón la biológica, será imposible, quedando un -- 25% de los enfermos con pruebas positivas, principalmente las reacciones que detectan los anticuerpos IgG y las que estudian el comportamiento de la inmunidad

celular.

En la sífilis tardía, el tratamiento antibiótico detiene la evolución de la infección, dando lugar a una curación clínica, persistiendo los efectos de las lesiones tisulares y por supuesto la reactividad de las pruebas serológicas e inmunológicas.

Ante estos hechos nos preguntamos. ¿Que porcentaje de positividades se encuentran en los diferentes estadios de la enfermedad después de haber seguido un tratamiento correcto por un espacio de más de dos años?. ¿Cuándo podemos dar por curados a los enfermos con pruebas serológicas positivas?.

Creemos que estas dos preguntas pueden ser contestadas al analizar y constatar los resultados anteriormente hallados.

En la sífilis temprana observamos que quedan con pruebas positivas el 25% de los enfermos, estos enfermos corresponden a aquellos pacientes que han retrasado el comienzo del tratamiento.

En la sífilis secundaria la persistencia de las pruebas positivas asciende al 33%; en la sífilis terciarias hasta el 92% del total de los casos. Y en la sífilis serológicas hasta el 100% de los sueros exami-

nados.

DAVIS y DULBECCO (1972); GAY PRIETO (1968); han comprobado que en la mayoría de los enfermos diagnosticados de sífilis tardías y latentes, las pruebas de laboratorio permanecen positivas durante toda la vida, a pesar de la reiterada e intensa terapéutica antisifilítica. La persistencia de los anticuerpos, en estos casos, no comporta obligatoriamente la necesidad de tratamiento posterior, puesto que los títulos de los anticuerpos pueden declinar lentamente tras la curación clínica de la enfermedad. Es raro, diríamos excepcional, que con la serorreactividad persistente, el proceso progrese y se presenten nuevas recaídas.

Lo cierto es, que en la actualidad el criterio de curación que se defendía hace algunos años: serología reagínica negativa y dos test de Nelson negativos tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo con tres meses de intervalo, no puede mantenerse.

La curación de la enfermedad con pruebas serológicas positivas sólo puede determinarse con las valoraciones cuantitativas de todos los anticuerpos.

Los anticuerpos específicos IgM están incluidos

en las inmunoglobulinas. Solamente se producen cuando hay una infección activa a expensas de los linfocitos B "plasmocitos" que son los mismos que sintetizan otra clase de anticuerpos. Estos anticuerpos IgM son los primeros que se producen, habiéndose demostrado su presencia en la sangre unos 5 días después del estímulo antigénico, alcanzando el máximo de su secreción a los 15 días. GANNEFAX, NORIAS y col. (1967). - La vida media de los anticuerpos IgM viene siendo de 45 días y siempre se producen en presencia del antígeno, luego teóricamente se puede pensar:

a) La presencia de anticuerpos IgM específicos es indicio de infección activa. JOHNSTON (1972); SOLTANI y col. (1978).

b) La persistencia de los anticuerpos IgM en un enfermo después de un tratamiento nos estará indicando que dicho tratamiento ha sido insuficiente, o inadecuado, O'NEILL y NICOL (1972).

La pertinaz permanencia en cantidades mínimas de anticuerpos IgG, detectados por la reacción de la inmunofluorescencia absorbida se nos traduce en un inconveniente a la hora de valorar la curación, pues como hemos podido observar se siguen detectando dichos

anticuerpos en enfermos dados por curados clínicamente hace muchos años, incluso en aquéllos que se curaron en los estadios primarios de la enfermedad. Concretando, cuando detectamos los anticuerpos IgG específicos, puede ocurrir una de estas dos cosas: bien que los títulos sean muy altos, en cuyo caso tiene importancia diagnóstica clara, indicando una infección activa, o bien que sus títulos sean mínimos y entonces pudiera tratarse de anticuerpos residuales de una infección si filítica ya curada. Nuestro problema radica pues en de terminar el nivel a partir del cual los anticuerpos IgG dejan de ser una presencia inmunológica residual, para convertirse en indicación de una infección aún no curada.

Para determinar este título, hemos estudiado los sueros de 181 pacientes sifilíticos tratados correctamente hace más de dos años, con pruebas positivas: las reagínicas inferiores a 8 dil., F.T.A. abs IgG positivo más bajo de 100 dil., Test de Nelson reactivo y el Test de IgM negativo.

Se ha seleccionado como límite superior 100 dil. debido a que habitualmente cuando se practican las diluciones con el FTA 200 suele darse dicho título como resultado positivo dudoso y no tendría razón de ser se

leccionar sueros sin ninguna duda positivos.

Tampoco se concede importancia diagnóstica a la - reacción de inmunofluorescencia con título inferior a 25 dil., ya que esta intensidad se encuentra con relativa frecuencia en los sueros de individuos sanos o de algunos que padecen ciertas afecciones distintas a la lues, descartada previamente porque la anamnesis y la clínica no muestran ningún indicio de esta enfermedad, reforzando la sospecha de ser un positivo falso al -- Test de FTA, por la negatividad al Test TPI. PETZOLDT (1971), RIVERO (1975).

Tenemos pues según este criterio que hemos descri^{to} 3 grpos de pacientes

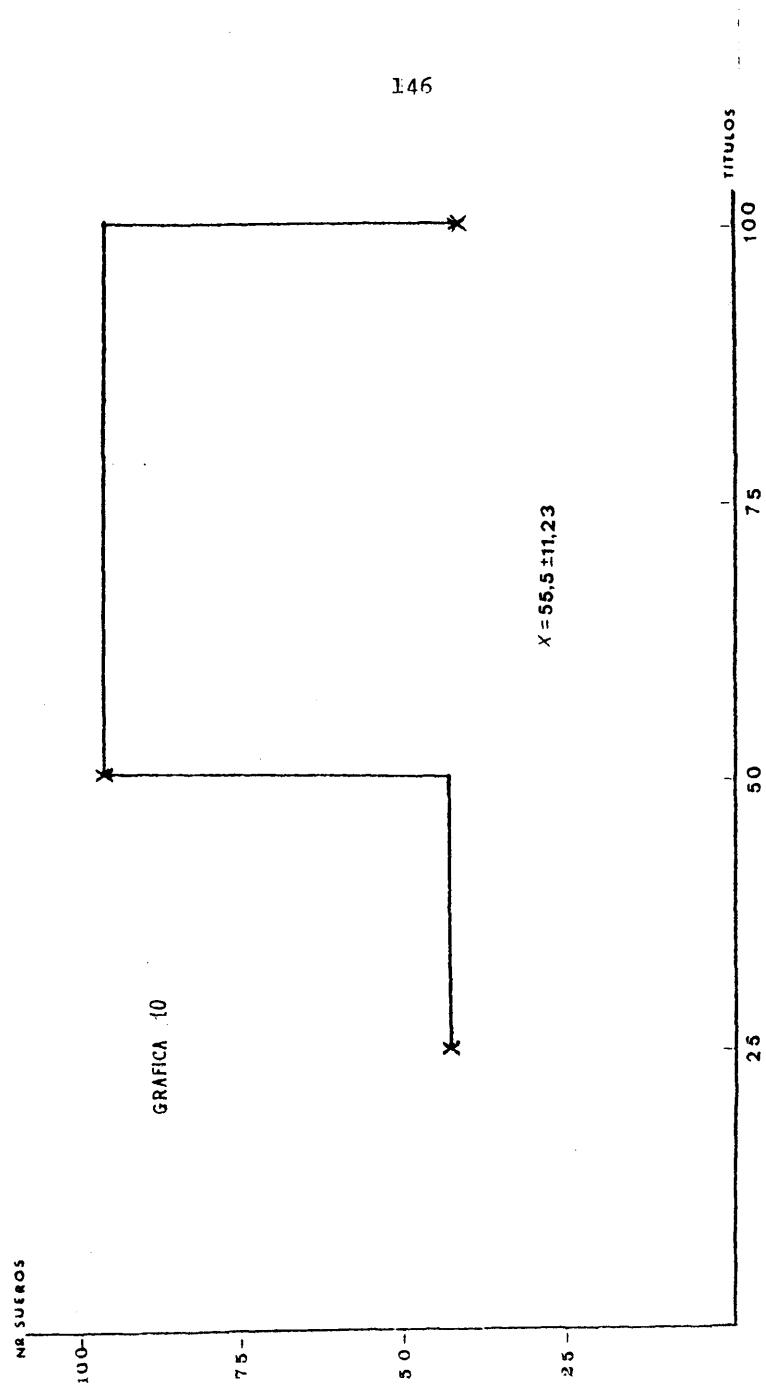
44 Enfermos de 25 dil.

95 Enfermos de 50 dil.

42 Enfermos de 100 dil.

Con los resultados obtenidos en todos y cada uno de los grupos confeccionamos una representación gráfi^{ca} (fig 10), colocando en abscisas los títulos y en - ordenadas el n° de sueros correspondientes, y calcula^{mos} el Índice de Dilución Medio con relación al núme^{ro} de casos

$$x = 55,5 \pm 11,23$$



$$X = 55,5 \pm 11,23$$

INDICE DE DILUCION EN RELACION CON EL Nº DE CASOS

Este índice según las leyes estadísticas referentes a los test de conformidad para una serie de experimentos u observaciones nos indica el nivel máximo de dilución de un suero a que pueden encontrarse los anticuerpos IgG treponémicos para dar por curado al paciente. Naturalmente los métodos estadísticos no pueden decir que estos o aquellos resultados den una prueba definitiva de la teoría considerada, pero permiten afirmar a priori con una muy elevada probabilidad. Esto viene confirmado en la práctica de una manera concluyente por nuestras observaciones experimentales ya que siempre que hemos efectuado controles a pacientes que tenían reacción de inmunofluorescencia positiva con títulos menores a 55 dil., hemos visto que iban espontáneamente en paulatino descenso, esto es, eran ya pacientes que podrían darse como serológicamente curados.

Por el contrario, cuando hemos seguido la evolución de pacientes con títulos superiores a 55 dil., a menudo tuvimos ocasión de comprobar como no se producía un descenso de la titulación sino que frecuentemente se observaban recaídas.

Este índice que hemos conseguido, complementa de

un modo más cuantitativo y claro las indicaciones obtenidas cuando sólo se tenían en cuenta las pruebas clásicas. Luego para considerar curado a un enfermo sifilítico tratado, con pruebas positivas deben cumplirse las siguientes premisas.

1ª.- IgM específica negativa

2ª.- Serología reagínica positiva inferior a 8 dil.

3ª.- F.T.A. abs. IgG positiva por debajo de 55 dil.

4ª Test de Nelson generalmente positivo.

Las pruebas positivas deberán descender paulatinamente a lo largo del tiempo sin emplear nuevos tratamientos.

Informes técnicos de la OMS (1975) y (1976).

GARCIA PEREZ (1971-1974); GAY PRIETO (1973-1978).

ATLER (1976), GUTHER (1976), GOMEZ ORBANEJA (1976)

CABRE (1977), KING y NICOL (1975), DAVIS y DULBEC CO (1972).

DISCUSION

Los datos de las pruebas practicadas no han sido fáciles de interpretar, por la gran disparidad de los parámetros que valoran.

Se han agrupado las diferentes pruebas en dos -- grandes grupos: pruebas, generalmente aparecidas en -- los últimos años, que estudian la Inmunidad Celular -- (I.C.) y las antiguas pruebas que ponen de manifiesto la Inmunidad Humoral (I.H.). Ambas técnicas gozan de ventajas e inconvenientes.

Las pruebas de I.C. estan representadas todas ellas por el T.T.L.; esta es de gran sensibilidad con manifiesta complejidad técnica, pero de prometedor futuro al no haberse detectado falsas reacciones. Las -- de I.H. tienen sus representantes en diferentes pruebas ya que cada una de ellas valora anticuerpos distintos: reaginas, inmunofluorescentes, e inmovilizan-

tes; son de sencillez manifiesta, menor sensibilidad y con falsas reacciones biológicas. GISLER y PILLOT -- (1968), BUCHANAN y col. (1970), RIVERO (1974) y SEPET JIAN y col. (1975).

Los resultados más precoces para detectar la infección sífilítica los hemos conseguido con la prueba de transformación blástica de los linfocitos, incluso antes de la aparición del chancro (personalmente hemos detectado varios casos) alcanzando una especificidad del 70% en sífilis primaria; este resultado está en consonancia con los trabajos de varios autores como LEVENE TURK, WRIGHT, GRIMBLE, (1969), JANOT, GRADIERE, PUPIL, THOMAS (1971) Y PASSET, BODANOX, GROSSNAUS, HEID, TARDIEU, EMOLIEF y HALVILLA (1972).

Asimismo, nuestros resultados están en desacuerdo con autores como: FESTENSTEIN, AHRAHAMS, BOKKEMHAUSER, (1967), LEVENE y WRIGHTM (1971), MUSHER SCHELL y KNOX, (1974), MUSHER col. (1975), WRIGHT y GRIMBLE (1971); -- que afirman que la inmunidad celular está abolida o -- muy disminuida en la sífilis primaria. Es fácil observar que en este punto hay dos tendencias contrapuestas todos los autores coinciden que hay una disminución de la respuesta de inmunidad celular cuando se estudia --

dicha respuesta mediante la estimulación con mitógenos en los periodos de sífilis temprana WILKINSON -- (1976). Sin embargo esta respuesta inmunológica deprimida no se manifiesta en lo concerniente a la transformación blástica de los linfocitos cuando ponemos -- como antígeno los treponemas, y creemos que esta aparente paradoja tiene su explicación en los puntos siguientes:

1º) Los autores no coincidentes con estos resultados emplean como antígeno treponemas no patógenos, -- por ejemplo el treponema Refringens, MUSLER y col. -- (1975).

2º) Utilizan dichos autores como estímulo antigénico, excesivo número de treponemas o bien treponemas deteriorados por el ultrasonido en el medio de cultivo de los linfocitos FROM y col. (1976).

3º) Emplean para realizar dicho test, plasma o -- suero del enfermo como medio enriquecedor, y sabemos desde LEVENE y col. (1969) que este suero o plasma -- posee un factor inhibidor de la transformación.

4º) El tiempo de permanencia óptimo, para que -- exista una buena transformación blástica de los linfocitos, debe ser como mínimo cinco días en lugar de --

las 72 horas que preconizan la mayoría de los investigadores.

En los resultados conseguidos en las sífilis secundarias, tardías o latentes se observa un consenso general, incluso empleando las metodicas más diversas, alcanzando todas ellas un 100% de especificidad.

Podemos decir que la transformación blástica es una reacción muy útil para un diagnóstico precoz de la enfermedad y no deberíamos omitirla en ningún caso ante la posible sospecha de un contagio, sin esperar a la aparición del primer síntoma clínico o incluso de otros resultados de laboratorio. Tendremos que tener en cuenta que esta prueba, sólo se puede hacer en laboratorios muy especializados y preparados en inmunología, con lo cual se limitará de momento la generalización. Tampoco nos será posible con ella resolver el problema más acuciante, el del criterio de curabilidad pues cuando se ha hecho positiva, no desaparecerá, incluso en pacientes que hayan conseguido la negativización de todas las pruebas humorales.

Los diferentes anticuerpos que ponen de manifiesto la Inmunidad Humoral de la sífilis se comportan distintamente según sea el período en que se encuentra la enfermedad.

Desde el alto grado de sensibilidad del 70% que alcanzan los anticuerpos IgM en la sífilis primaria, a la no aparición de los anticuerpos inmovilizantes, hay un amplio camino ocupado por las otras pruebas.

No hay ninguna prueba tanto humoral como celular, que nos pueda aclarar una sífilis congénita sin síntomas clínicos, excepto la puesta en evidencia de los anticuerpos IgM. Estos anticuerpos son los únicos que puede fabricar el feto desde el cuarto al quinto mes de vida intrauterina. Los otros anticuerpos de aparición más tardía, comienzan a generarse después del nacimiento, por lo cual, tenemos que pensar que dichos anticuerpos, cuando se detectan, no son anticuerpos propios del feto sino que son anticuerpos de la madre que han cruzado la barrera placentaria.

Algunos autores ponen en duda que los anticuerpos IgG e IgA no se produzcan antes del nacimiento, pues se apoyan en las observaciones de SOUTH (1976), de que el sistema de células B está bien desarrollado al final del trimestre, al poderse demostrar por estas fechas, que ciertos elementos celulares estaban recubiertos de IgG, IgM e IgA en las mismas proporciones que en el adulto.

Desde luego, tenemos que admitir que existe una - producción de anticuerpos antes del nacimiento pero -- tendremos en cuenta que esta elaboración de anticuer-- pos no ocurre ante cualquier clase de antígeno; hasta ahora sólo se ha podido demostrar su secreción a mi-- tad de la gestación frente a virus o espiroquetas.

Este hecho revela la existencia de una jerarquía regular entre los antígenos. Algunos como los virus - de la rubeola pueden ser reconocidos en fases muy pre-- coces. Otros por el contrario, no pueden ser reconoci-- dos "in útero" ni meses después del nacimiento, como el H. Influenzae.

Esta jerarquía de los diversos antígenos es la - misma en todos los seres humanos, así como en el cor-- dero, la rata y el ratón, etc. SHERWNN, ROWLANDS --- (1975).

El informe KAUFMAN de 1975 analiza con juicio -- crítico, los datos obtenidos de más de 15 artículos - aparecidos en la literatura médica sobre el tema de - la IgM sifilítica congénita desde los años 1969 al -- 1973 cuyas conclusiones se reúnen en:

1º) El 88,4 de los niños que nacen con síntomas clínicos de sífilis son reactivos a la IgM dentro de

las primeras semanas de vida.

2º) Un 65% de los niños que nacen sin síntomas - clínicos de sífilis son positivos a la IgM.

Nosotros hemos llegado a obtener resultados equivalentes a los de los investigadores posteriores al informe KAUFMAN, que son más exactos y sensibles, elevándose sobre los porcentajes anteriores, debido a los - avances técnicos conseguidos, obteniendo mejores globulinas antihumanas e incluso más selectivas como las inmunoglobulinas conjugadas de cadenas pesadas anti IgM empleadas en nuestras determinaciones, así como tam-
bién en los trabajos de HUNTER (1975), HUNTER, MADDI-
SON, LARSEN, FELKER y FEELEY (1976).

Otros factores que también han coadyuvado a la - precisión de los datos conseguidos, han sido la apli-
cación de la técnica F.T.A. IgM a la fracción sérica que contiene con exclusividad la Inmunoglobulina IgM del enfermo, MULLER y LOA (1974).

Esta fracción ha sido aislada mediante el trata-
miento del suero por el paso en columna de S.JOBBAZY (1970), o absorbiendo previamente los anticuerpos IgM mediante el paso del suero por un filtro impregnado -
de anti IgG. De esta forma hemos llegado casi al 100%

de especificidad de la prueba en todos los casos de sí filis temprana y latente, WILKINSON y RODIN (1976) y - ya no se encuentra ningún caso de IgM en los enfermos - después de un año de tratamiento PURITZ y col. (1975).

De todas las maneras, hoy en día se ha demostrado que no siempre que se evidencia la presencia de IgM re activa a los treponemas, existe sífilis activa como ha sido evidenciado por muchos autores como REIMER, BLAK y col. (1975), REMINGTON y KLEIN (1976); en algunas sí filis antiguas de homosexuales, muy tratadas en que la reinfección ha sido descartada. LASSUS (1969), WILKINSON (1976) y entre nosotros NOGALES, CLAVERO y BOROBIO (1977); en sífilíticos tratados repetidamente. También se ha encontrado este mismo fenómeno en enfermos con padecimientos diferentes a la sífilis, HYDE y col. --- (1975), en Toxoplasmosis congénita, PERSON (1977), en artritis reumatoide y colagenosis diversas e incluso - en cánceres.

Este fenómeno ocurre porque los anticuerpos IgM - que se unen al antígeno treponema pallidum en el test F.T.A. IgM no son de especificidad antitreponémica. -- Más bien en algunas ocasiones parecen ser anti IgG, y están vinculados a las moléculas anti IgG Treponema --

Pallidum en el suero de pacientes que suministran una inicial capa que recubre al treponema. Así en algunos casos el test de F.T.A. IgM aplicado a otras infecciones congénitas, puede no ser específico y operar análogamente al test de fluorescencia del factor reumatoideo.

Este factor se puede descartar con suma facilidad, haciendo al suero del presunto enfermo la prueba del Latex siguiendo la pauta preconizada por WILKINSON.

Generalmente observamos que, cuando el tratamiento ha sido correcto y no ha habido una nueva infección, los anticuerpos IgM desaparecen por completo en un período de tiempo que nunca sobrepasa los dos años, pudiéndose apreciar el descenso de los títulos en los resultados obtenidos por los investigadores que practicaban sistemáticamente pruebas cuantitativas, FRIBOURG - BLANC SIBOULDET (1972), poniéndonos sobre aviso ante una estabilización de los títulos que enseguida nos lleva a pensar en una falsa reacción a la inmunofluorescencia por la posible aparición en estos casos del factor reumatoideo. Debe desecharse la idea muy extendida de que estos anticuerpos se formaban ante el estímulo de las formas espiroquetales en los ganglios linfáticos y líquidos corporales de los antiguos sífilis.

cos. SMITH y col. (1967-1968), GOLDMAN y col. (1967), LAWTON, SMITH e ISRAEL (1967); DUMBOPEM (1972); confirmando que la virulencia no era tal, sino que más - que nada era un problema de metodología. TURNER y col. - (1969), TRAMONT (1976).

También podemos constatar, al hacer las valoraciones cuantitativas de las otras inmunoglobulinas o de las inmovilinas, el curso descendente del título de dichos anticuerpos hasta llegar al límite de positividad de 55 dil. para las IgG, a partir del cual no hemos observado ninguna recaída en dichos enfermos.

Los anticuerpos antilipoideos al hapteno de Wasserman o reaginas, por sernos más fáciles de determinar están mejor estudiados por todos los autores, --- afirmando que ocurre lo mismo que con los otros anticuerpos. Hemos visto que la disminución del título de la reagina es tanto más rápida cuanto más precoz haya sido el tratamiento; para llegar a una reacción negativa será preciso esperar varias semanas en la sífilis primaria, algunos meses en la sífilis secundaria y con frecuencia varios años o toda la vida en una sífilis terciaria o latente.

Durante este período postterapéutico más o menos -

largo durante el cual las reacciones serológicas son positivas, la presencia de la reagina en la sangre -- del enfermo no significa necesariamente enfermedad -- activa, habiéndose llegado al convencimiento que después de dos años de tratamiento, los enfermos que -- tienen un título por debajo de 8 dil. están curados, lo que confirman las estadísticas internacionales -- efectuadas por los especialistas de O.M.S. y entre -- nosotros el Prof. Gay Prieto. Sólo un aumento persistente del título de la reagina permitirá afirmar que existe una infección o recidiva que supondrá una reanudación de la terapéutica.

La caída incluso lenta e incompleta, de la curva serológica será la demostración más clara de la -- curación del enfermo (que vendrá a reafirmar un tiempo más tarde la negativización serológica).

Los sífilíticos antiguos, después de dos años -- de tratamiento perfectamente realizado, con pruebas de inmunidad celular e inmovilinas positivas, títulos de inmunoglobulinas específicas IgG por debajo -- de 55 dil., reagentes inferiores a 8 dil. e IgM negativas se podrán dar por curados.

CONCLUSIONES

1ª.- Comprobar en el suero del paciente la presencia de globulinas específicas y valorarlas cuantitativamente es premisa necesaria para determinar la existencia de enfermedad.

2ª.- Diagnosticar precozmente una sífilis, incluso antes de que aparezcan síntomas clínicos, y seguir la evolución de los títulos de los anticuerpos puede contribuir en gran manera a un correcto enjuiciamiento del pronóstico de la enfermedad.

3ª.- Tratar la sífilis en sus primeros estadios es la mayor garantía que poseemos para lograr la curación tanto clínica como serológica de la enfermedad.-

4ª.- Las pruebas que más precozmente detectan -- una infección treponémica, son aquellas que investigan la inmunidad celular.

5ª.- La detección de anticuerpos sifilíticos mediante un solo test aislado no tiene valor determinante para el diagnóstico de la enfermedad luética, sería necesario para ello realizar valoraciones cuantitativas seriadas de cada uno de los diferentes test.

6ª.- Las condiciones idóneas para conseguir una valoración óptima de la infección sifilítica mediante la prueba de la transformación blástica de los linfocitos son:

- A.- Que el estímulo antigénico esté constituido siempre por treponemas patógenos enteros.
- B.- Que el número de treponemas utilizado como antígeno esté comprendido entre 1 a 4×10^4 por cada cc. de medio de cultivo.
- C.- Que para enriquecer el medio de cultivo se emplee suero humano AB o fetal de ternera, nunca plasma o suero del propio enfermo.
- D.- Que el tiempo de incubación del cultivo sea de 5 días exactamente.

E.- Que la cantidad necesaria de linfocitos del paciente para el cultivo esté comprendida entre $0,75$ a 1×10^6 por cc. - de medio empleado.

7ª.- La positividad de la transformación blástica de los linfocitos nos inducirá a pensar que el paciente ya ha tenido contacto con la enfermedad.

8ª.- La secuencia de aparición de los anticuerpos en el suero de los enfermos sigue un determinado orden: IgM, IgG, reagentes e inmovilinas.

9ª.- Algunas globulinas son capaces de atravesar la barrera placentaria como las IgG, otras como las IgM no pasan normalmente al feto.

10ª.- Ante una sífilis congénita sin manifestaciones clínicas el único dato aclaratorio para saber si el neonato está infectado sería la demostración de la globulina específica IgM en el suero del recién nacido.

11ª.- Ante la presencia de globulinas específicas IgM en el feto es necesario investigar si ha existido una alteración placentaria, y por lo tanto pudieron di

chas globulinas ser de procedencia materna. La valoración de la ceruloplasmina en la madre e hijo nos aclarará esta disyuntiva.

12ª.- Los anticuerpos IgM suelen negativizarse al seguir el tratamiento correcto.

13ª.- Cuando un enfermo es diagnosticado y tratado correctamente en periodo primario las reacciones serológicas suelen negativizarse.

14ª.- Cuando el tratamiento se imparte en periodo secundario suelen negativizarse las reacciones reagínicas pudiendo mantenerse positivas durante algun tiempo las otras reacciones como el F.T.A. IgG y el test de Nelson.

15ª.- Si el tratamiento se ha instaurado en periodo de latencia, las pruebas reagínicas PTA. IgG y test de Nelson pueden permanecer positivas durante toda la vida.

16ª Cuando un enfermo con pruebas serológicas positivas ha seguido correctamente el tratamiento durante más de dos años, es condición necesaria para considerarlo curado que los títulos de dichas pruebas sean infe-

rioren a

V.D.R.L. 8 dil
 F.T.A. Abs. IgG55 dil
 F.T.A. Abs. IgM NEGATIVO

17ª Si ante un enfermo tratado correctamente permanecen positivas las pruebas de fluorescencia con anti IgM debemos pensar que se trata de una falsa positividad, cuya causa pudiera ser entre otras la presencia del factor reumatoide en el suero del enfermo.

18ª.- Un incremento en los títulos de los diferentes anticuerpos de los enfermos que han estado hace más de dos años sometidos a tratamiento, nos hará sospechar en una nueva infección.

19ª.- El reiterado hallazgo de reacciones positivas con títulos bajos e inestables a un solo test nos hará pensar que se pudiera tratar de una falsa positividad biológica.

20ª.- La prueba con la que se obtiene menor número de falsas reacciones positivas es el Test de Helson con gran diferencia sobre las demás.

B I B L I O G R A F I A

ABRAND, J.R. MITCHEM, H. KOFFER, and A.E. VATTER.-

Diferentiation within the bacterial flagellum and -
isolation of the proximal hook. J. Bacteriol. 101:
205-261:1970.

ACKERMAN B.D.- Congenital Syphilis observation labo
ratory diagnosis of intrauterine infections J. Pe--
diat. 74:459-462.1969.

ALFORD C.A.- Schafer J. and Blankenship.- Acorrela-
tive immunolog microbiologic and clinica approach -
to the diagnosis of acute and cronic infections in
newborn infants. N. Eng. J. Med. 277-437.1967.

ALFORD Ca Jr. POLT S.S. CASSADY Ge et al: IgM fluo-
rescent treponemal antibody in the diagnosis of --
Congenital Syphilis. N. Eng. J. Med. 280:1086-1091-
1969.

ASHERSON.- Transformación blástica de los linfocitos por otras sustancias diferentes de PHA. Brit.- J. Hosp. Med. (español) 37:19.1973.

AUGENER W.- Immunanalyse von Glykoproteinen, proteides of the biological fluids: 363-Elvesier. Amsterdam. 1965.

AZUMA, I.T. TANIYAMA, Y. YAMAMURA, Y YANAGIHARA, Y. MATTORI, S. YASUDA and I. MIFUCHI.- Chemical studies on the wall of Leptospira biflexa strain Urawa and Treponema pallidum strain Reiter J. Microbiol - 19:45-51.1975.

BASSERMAN J.B. WORSHP.- On the Biology of treponema pallidum cultivation and Vaccine Development. J.- of Infec. Dis. 2-308-311. 1977.

BASSERMAN J.B.- and Hayes N.S. Protein Synthesis by treponema pallidum extracted from infected rabbit - tissue. Infec. Immunol. 10:350. 1950.

BASSET A. BADANOIU A. GROSSHAUSE HEID y col.- Estudio de la reactividad inmunocelular en la sífilis - mediante el test de transformación blástica de los linfocitos "in vitro". Rev. Cli. Esp. 1-9. 1972.

BAUGHN R.E.- Effect of sensitization with propian-bacterium acnes on growth of listeria monocytogenes and treponema pallidum in Rabbits. J. Inmu. -- 118:1. 1977.

BECKER W. RAPP H. und STURIKO.- Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteine durch unimmunprazipitation-Z. Klin. Chem. 6:113. 1968.

BENGT. HEDERSTEDT.- Studies on the treponemas Pallidum Immobilization reaction by normal and immune sera WHO/VDI/RES/277. 1972.

BERGEYS.- Manual of Determinative Bacteriology 9 E. the Williams Wilkins Company. Baltimore 1.974.

BLAKEMORE, R.P. and E. CANALE-PAROLA.- Morphological and ecological characteristics of Spirochaeta -plicatilis Arch. Microbiol. 89:273-289. 1973.

BLANQUET P.E.- Ultrahistochemical study on the ruthenium red surface staining I. Processes which give rise to electron-dense marker. Histochemistry -- 47:63-67. 1.976.

BLANQUET P.R..- Ultrahistochemical study on the ruthenium red surface staining II. Mixture and affinity - of the electron-dense marker. Histochemistry 47:175-189. 1976.

BODANOEN A. Et. TARDIEU J.C..- Untersuchung der immunzellularen reaktion bei der lues mit hiesiges Lymphocyten transformation test in vitro. Munch Mediz Woch 114:1173-1178. 1972.

BOROBIO M.V. CLAVIJO M.J. NOGALES M.C..- Correlación entre pruebas serológicas en el diagnóstico de la sífilis. Va Cong. Nac. de Micro. de Santiago. 1977.

BOWSZIC J. and BOWSZIC J.A..- Über den Hemmungs test - der makrophagen in verlauf der unbehandelten lues.- Arch. Derm. Forsch 251:22. 1975.

BOWSZIC J. BOWSZIC J.A..- Lymphocyte transformation - and DNA synthesis. Derm. Mschr. 4:311. 1975.

BOWSZIC J. GDANSK A.M..- The cerebrospinal fluid in syphilis in the aspect of immunological studies. --- Posegl. Derm (Polonia) 2:365. 1975.

BOWSZYC J.GDANSK A.M.- Specific antibodies in untreated and treated syphilis. Przegl. Derm. (Polonia) -- 3-361. 1975.

BOYUM, A.- Separation of Leucocytes from blood and bone marrow. Scand J. Clin. Labor invest 21 Suppl. 99 1.968.

BRADFIELD J. and CUTER DB.- Electron microscopic evidence on the structure of spirochaetes. Nature 169. 944-960. 1974.

BROWN W.J. DANOHUE, JAMES F.- Evaluation of RPR. card test for Syphilis Screening in Field Investigation. Public Health Report 79:496. 1964.

BRUCE R. BAUNGARTNER, WENGER.- Fluorescent-treponemal antibodyabsorption test in patients with aortic valvular insufficiency-WHO/VDT/206. 1970.

BUCHANAN C.S. and HASENCK J.R. F.T.A.- abs test in pregnancy. Archi of Derma. 322-326. 1970

CANNEFAX G.R. NORINS L.C. and ALLESPIE E.J.- Immunology of Syphilis ann. Rev. Med. 18:471-1967.

GARON C.- Cellular immune aspect of the human fetal maternal relation hipo I. in vitro response of card blood limphocytes Pha-Cellinmu. 5:21-29. 1972

CARK J. and YOBS A.- Brit J. Vener. Dis 41:260. 1968

CLANEST A.M.- Practical methods in electron microscopy. 3 North Holland Publishing Co Amsterdam: 1974.

CLARKSON K.A.- Technique of darkiels examination.- - Med. Tech. Bull 7:199. 1956.

COHEN S.M. DUCHARME G.P. CARPENTER C.A.- and Deibel Rubella antibody in IgG and IgM immunoglobulins detected by inmufluorescence. J. Lab. Clin. Med. 72: 760. 1969.

COLLART P. BOREL L.J. DUREL P.- Significance of spiral Organism found, after treatment in late human - au experimental syphilis Br. J. Vener Dis. 40:81. 1964.

COONS.- Anaes Rev. Microbial 8:333. 1954.

COWAN S.T.- Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge. 1974.

COX C.D. and Barber M.K. Oxygen uptake by treponema Pallidum Infec. Immunol. 10:123. 1974.

CUTLER J.C. Endemic Syphilis, Yaws, and Pinta.- Population Division Graduate School of Public Health University of Pittsburg. Pennsylvania. 1976.

CHACKO C. W.- Accidental human infection in the laboratory with Nichols rabbit adapted virulent ---- strain of T. Pallidum. Bull W.H. 0/35/809/1966.

DAVIES J.W.- Venereal Diseases in Canada on 1971. - Health and Welfare. Canada 1972.

DEACON W.E. FALCONE V.H. and HARRIS. A Fluorescent test for treponemal antibodies. Proc. Soc. Exper. - Biol. Med. 96:477. 1957.

DEACON W.E. FREEMAN E.M. and HARRIS.- Fluorescent - treponemal antibody test Modification based on quantitation FTA-200. Proc. Soc. Expr. Biol. Med. 103:-- 827. 1960.

DEACON W.E. and HUNTER E.F.- Treponemal antigens - as related to identification and syphilis serology. Proc. exp. Bio. Med. 110:352. 1962.

DELHAUTY J.J. CATTERAL R.D.- Immunoglobulins in syphilis. Lancet II.1099-1969.

DUMLOP E.M.- Persistence des treponemes après traitement. Bri. Med. J. 2:577. 1972.

DUPONEY P.- Structure antigenique des treponemes: - Ann. Inst. Pasteur 122-2-1972.

DYCKMAN J.D.- Wende R.D. Gentembein D. and Willians R.P. Evaluation of Reagin .Sceen, a new serological test for Syphilis. J. of Clin. Microb. 4-145-150. - 1976.

EDVARD E.A.- Detecting Treponema Pallidum in primary lesions by the fluorescent antibody technique-Publi. Health. Rej. 77:427-.962.

EINBINDER J.M. and ODSOE.- Evaluation of the fluorescent treponemal antibody abs test. A micromethod. J. Lab. Clin. Med. 1970.

EIPERT S.R. and S.H. BLACK.- The cytoplasmic fibrils of T. refringens I. isolation and ultrastructure of the fibrils arch. Microbiol 1976.

EIPERT S.R. and S.H. BLANCK.- The cytoplasmic fibrils of *T. refringens*. II. Relationship of the fibrils - to the Helical shape of the cell and the associations of the fibrils with D.N.A. Arch. Microbiol 1.976.

ELSAS F.J.- Smith J.L. Israel C.W. and Gager W.E. - Brit. J. Venes. Dis. 44-267. 1968.

FELMAN Y.N. MORRISON J.M.- Examining the homosexual Male for sexually transmitted diseases. Jama 238-2046- 1977.

FITZGERALD T.J. MILLER J.N. and J.A. SYKES.- *T. pallidum* (Nichols strain) in tissue cultures cellular attachment entry, and survival.- Infect. Imm. 11:113-1140. 1975.

FITZGERALD T.J. JOHNSON and ET WOLFF.- Mucopolysaccharide Material Resulting from the Interaction of *Treponema pallidum* (Nichols strain) with Cultured Mammalian cells: Infect. Immunol 22:575-584. 1978.

FORTEZA BOVER G.- Atlas de Citologia Sanguínea. Edit. Toray S.A. 1963.

FRIBOURG-BLANCET, SIBOULEL.- Aspects serologiques -
des recontaminations treponemiques. Spc. Fran. de -
Derm et de Syphi. 1772-1975.

FRIEDMANN P.S. and TURK J.L.- A spectrum of lymphocy
te responsiveness in human syphilis. Clin. Exp. Immu
nol. 21:59-1975.

G^a PEREZ A. y PEREA PEREZ.- Enfermedades de transmi-
sión sexual. Pub. Univ. de Sevilla 1980.

GARCIA PEREZ.- Introducción a la dermatología 472-76
Salamanca 1971.

GAY PRIETO J.- La sífilis en la actualidad-antibióti
cos. 1.972.

GAY PRIETO J. y GUTHE T.- Treponematoses y enfermeda
des venéreas, 4^a ed. Barcelona 1969.

GAY PRIETO J.- Compendio de trepanomatoses y enferme
dades transmitidas sexualmente. Edi. Científico-Médi
ca. Barcelona 1978.

GESLER R. PILLOT J.- Activite anticardiolipide liu a
un complexe macroglobuline de Waldaestrone IgG crio-
precitout - WHO/VDT/RES/150. 1968.

GIBBONS R.J. and J. VAN HOUTE.- Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu. Rev. Microbiol 29: 19-44. 1975.

GIBOWSK M. and ROSNER.- Serum immunoglobulins in the course of early syphilis. Przegl-Derm. (Polonia) 2-- 199. 1975.

GJESTLAUD T.- The Oslo study of untreated syphilis: An epidemiological investigation of natural course of untreated syphilitic infection based upon a restudy of the boeck-Brunsgaard material. - Acta - Derm 35 suppl 34. 1955.

GRAVES S. and T. BILLINGTON.- Optimum concentration of dissolved oxygen for the survival of virulent T. pallidum under conditions of low oxidation - reduction potential. Brit. J. Vene. Dis. 55:387-393.1979.

GRIN E. NADACDIN M. et PASIC.- Etudes des immunoglobulines par F.T.A. (IgG, IgM) et immunodiffusion quantitative IgG, IgM, IgA In endemic syphilis Act, Dem. Vener. Iugoslavia 1:5-1974.

GUTHE T.H.- Climate of opinion regarding the venereal diseases in a changing' environment-Royal Inst. of Public Health and Hygiene-Londres 1968.

HARDY P.H. and NELL E.F.- Influence of osmotid pressure on the morphology of the Reiter treponema. J. Bact. 82-967-1961.

HAROLD FOX M.B.- Problemas de las enfermedades venéreas en la práctica general. The practitioner (en español) 136:32-39. 1977

HARRIS A. ROSEMBERG A.A. and L.M. RIEDER.- A micro--floculation test for Syphilis using cardiolipin antigen. Preliminary repot. J.Vener. Dis. Infor. 27,169: 1946.

HARRIS A.- Quantitative serologic test for Syphilis. I. A standar method of reporting. J. Vener. Dis. Inf 28,249. 1947.

HANSHAW J.B. STHEINFELD H.J. and WHITE.- Fluorescent antibody test for cytomegalovirus macroglobulins. New. Eng. J. Med. 279:566. 1968.

HOLLANDER DH and TURNER.- Syphilis experimental.- -

Annr. J. Syph. 38-489. 1955.

HOLT S.C.- Anatomy and Chemistry of Spirochetes. Mi

crobiol Rev. 42:114-160. 1978.

HOVAND HANGEN G.- Observations on the ultraestructu

re of treponema pallidum Nichols Who/VDI/RES/260. -

1971.

HOVIND-HOUGEN K.- The ultraestructure the cultivable

treponemas I. Treponema phagedenis, T. Vincentii and

T. refringens. Act. Pathol. Microbiol. Scand. Sect.

82:329-344. 1974.

HOVIND-HOUGEN K.- Further observation on the ultraes

tructure of treponema pallidum Nichols. Act. Pathol.

Microbiol Scand. 82:495-507. 1972.

HOVIND-HOUGEN K.- The ultraestructure the cultivable

treponemas II. Treponema minutum and T. microdentium

Act. Pathol. Microk. Scand. Sect. 82:495-507. 1974.

HOVIND-HOUGEN K.- The ultraestructure the cultivable

Treponemas III. Treponemas genitalis. Act. Pathol. -

Microbiol Scand. Sect. 83:91-99. 1975.

HOVIND-HOUGEN K. and BIRCH-ANDERSEN.- Ultraestructure of cell of *T. pertenue* obtained from experimentally infected hamsters Act. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. 84:101-108. 1976.

HUNTER E.F.- The fluorescent treponemal antibody absorption FTA Abs test for syphilis Crit. Rev. Clin. - Lab. Sci. 5-315-330. 1975.

HUNTER EP. MADDISON E. LARSEN S.A. FELKER M.B. and - FEELEY.- Immunoglobulin specificity for the FTA abs - conjugate. J. of Clin. Microbiol. 1976.

HYDE B.V. BARNETT E.V. REMINGTON J.S.- Method for differentiation of nonspecific from specific toxoplasma IgM fluorescent antibodies in patient treponema with rheumatoid factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148:1184. 1975.

IDSOE O. GUTHE T. and WILLCOX R.R.- BULLETIN of the World Health Organization mondiale de la sante. 47 -- suppl. 1972.

INGALL D. and NORINS L.- Infectious diseases of the - fetoes and newborn infant-414 Remington and Klein - Saunders Company-Philadelphie. 1976.

JACKSON S.W. and S.H. BLACK- Ultrastructure of T. -
pallidum Nichols Following lysis by physical and che
mical methods. I. Envelope, wall, membrane and fi---
brils. Arc. Microbiol. 76:308-324. 1971.

JACKSON S.W. and S.H. BLACK.- Ultrastructure of T.-
Pallidum Nichols following lysis by physical and che
mical methods II. Axial filaments. Arch. Microbiol.-
76:325-340. 1971.

JOHNSTON R.C.D.M. RITZI and B.P. LIVERMORE.- Outer -
envelope of virulent T. pallidum Infect. Immun. 8: -
291-295. 1973.

JOHNSTON NA.- Neonatal congenital syphilis diagnosis
by the absorbed fluorescent treponemal antibody IgM -
test Brit. J. Ven. Dis. 48:464-469. 1972.

JONES R.R. NEVIN T.A. GUEST W.J. and L.C. LOGAN.- Ly
tic effect of trypsin, lysozyme and complement of T.
pallidum Br. J. Vener. Dis. 44:193-200. 1968

JONES A.M. ZEIGLER J.A. and R.H. JONES.- Experimental
syphilis vaccines in rabbits I Differential protec--
tion with an adjuvan spectrum, Bri. J. Vener. Dis.
52:9-17. 1976.

JONES R.H. FINN M.A. TOMAS J.J. and C FOLGER.- Growth and subculture of pathogenic *T. pallidum* in BHK-21 - cultured tissue. *Br. J. Vener.* 52:18-23. 1976.

JOSEF R. and E. CANALE-PAROLA.- Axial fibrils of anaerobic spirochaetes: Ultrastructure and chemical characteristics *Arch. Microbiol.* 81:146-168. 1972.

KAHN W.N. ALI R.V. WERTHMAN M. and ROSS S.- Immunoglobulin IgM determination in neonates and infants - as an adjunct to the diagnosis of infection-*J. Ped.* 75:1282. 1967.

KAHN R.L.- Serology with lipid antigen, with special reference to Kahn and universal reactions, Williams Wilkins Co. Baltimore 1950.

KAUFMAN R.E. OLANSKY D.C. WEISNER P.J.- The FTA Abs. IgM test for neonatal congenital syphilis: A critical Review *J. Am. Vener. Dis. Assoc.* 1-79-84. 1974.

KEYOUMARS SOLTANI, IRIS K. ARONSON, FRED BRICKMAN, - and ALLAN L. LORINEZ.- Detection by Direct Immunofluorescence of Antibodies to *Treponema Pallidum* in the Cutaneous infiltrates of Rabbit syphilomas *J. Inf. Dis* 38-222-226. 1978.

KING A. and NICOL C.S.- Veneral Diseases 3^a Edic. -
154-157. Baillere Tindall-London. 1975.

KINYON J.M. HARRIS LL. and CLOCK R.D.- Entero-patho-
geniaty of varius isolates of T. hyodysenteriae. Inf
Inmun. 15-638-646. 1977.

KIPNIS J. CAMARGO M.E. NETLO C.F.- Neonatal congeni-
tal syphilis Diagnosis by the anti IgM treponemal --
fluorescence test. Rev. Inst. Trop. Sao Paulo 179---
183. 1971.

KIRALY K. BACKANOZ A. JOBBAGY.- Fluorescent trepone-
ma Antibody (FTA) test wiyth anti IgA, anti IgM and
IgG conjugates. Acta Derm. Vener. 48:362. 1968.

LENDSTEINR K. MUCHA V. WESHAUDL.- Wien Derm. Gesell-
sch. 1907.

LESSUS A.- The RA factor an apparently positive IgM
FTA test. Inst. Arch. Allergy 36:515. 1969.

LAURELL A.B. OXELLUX, ROSSMAN.- Serum immunoglobulin
levels in syphilis. Acta Derm. Vener. 48:268. 1968.

LAZZARO C. y LANZA.- Bull. Soc. Med. Chir. Catania - 33,287. 1965.

LEVADITI C.- Contribution a l'étude de la culture -- du Treponeme Pallidum. - Ann. Int. Pasteur 21:784. 1907.

LEVENE G.M. TURK J. WRIGHT D.J. GRIMBLE Ag.- Reduced Lymphocyte transformation due to a plasma factor in patients with active syphilis. Lancer 2:246. 1969.

LISTGARTEN M.A. and SOCRATSKY SS.- Electron microscopy of axial fibrils enter envelope, and cell division of certain oral, Spirochaetes J. Bact. 88:1087. 1964.

LISTGARTEN M.A. and S.S. SOCRENSKY.- Electron microscopy as an aid the Tasonomic differentiation of oral Spirochaetes. Arch. Oral. Biol. 10:127-138. 1965.

LONGHIN S. POPESCU A.- Biologia Treponemet Pallidum. Academi Republicii Socialiste Rumania. Bucarest 1969.

LOPES J. and W.E. INNESS.- Electron microscopy study of lipopolisacharide from au avian strain of E. Coli O.18 J. Bacteriol 103:238-243. 1970.

LYSKO P. and COX C.- Terminal electron transport in *T. Pallidum*. Infection and Immunity. 16:885-890-1977.

MAGNUSON H.J.- Inoculation syphilis in human volunteers
Medicine 35-33 Baltimore 1956

MAMUNES P. GAVE VG. BUDELL JV.- Early diagnosis of neonatal syphilis, evaluation of a gamma M. Fluorescent treponemal antibody test-Am. J. Dis. Child. 120:17-21-1970.

MANCINI G.J. VAERMAN A.P. CARBONARA J.F.- A single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins. (Brügge-1963). 370 Amsterdam 1964.

MANIKOUSKA-LESINSK W. and JAKUBOWSKI A.- Investigations on the connexion of antibodies detected by the immunofluorescence method with the various classes of immunoglobulins during untreated syphilis. WHO/VDT/RES 178-1969.

MANUAL OF TEST FOR SYPHILIS.- U.S.- Department of Health Education and Welfare. Public Health Service Publication No 411 Washington 1969.

Mc. CRACKEN GH HARDY JB CHEN TC.- Serum immunoglobulin levels in newborn infants. II Survey of card and followup sera from 123 infants with congenital syphilis. J. Pediat. 74:383-392. 1962.

MARTIN H.H.H. D. HEILMANN and H.J. PREUSSER.- Etate of the rigid-layer in cell walls of some gram negative bacteria. Arch. Microbiol 83:332-346. 1972.

MERKLEN F. BUZACOUX J. POTIER JC.Recherche sur les - classes d'immunoglobulins responsables des positives serologiques syphilitiques. Bull. Soc. Fra. Derm. - Syph. 75:57. 1968.

MIAO R.M. FIELDSTEEL A.H. and HARRIS D.L. - Genetics of Treponema Characterization of T. hyodisenteriae - and its relations hip to T. pallidum Infect. Immun - 3:736-739. 1978.

MICOL C.- Valeur semiologique des reactions de reagin positive. Pres. Medi. 74:1663. 1966.

MILLER MJ. SUNSHINE PJ. and REMINGTON.- Quantitation of card serum IgM and IgA as screening procedure to

detec congenital infection: results in 5006 patients
J. Pediat. 75:1287-1291- 1969.

MONGOMERY H.- Dermatopathology. New York 1967 Harpy
Rw V-1.

MULLER F. and LOA PL.- Cromatographis the IgM. Infec
2:127. 1974.

MUSHER D.M. SHELL R.F. and KNOX J.M.- In vitro lyn--
phocyte response to T. refringens in human syphilis.
Infec. Immun. 9:664. 1974.

MUSHER DM. SCHELL RF. JONES A.M.- Lymphocytes trans-
formation in syphilis : In vitro correlate of immune
suppresion in vivo-Infect. immun. 11-1261-1975.

MUSHER DM, SCHELL RF. KNOS.- Mecanismos inmunológicos
de la infección sifilítica . Cutis en Español 1-276-
279. 1976.

MUSHER D.M. SCHELL R.F.- Inmunología de la sífilis.-
Consulta 36:5-11. 1977.

NAUMAN R.K. S.C. HOLT and C.D. COX.- Purification -
ultrastructure and composition of axial filaments -
from Leptospira. J. Bacteriol 98:264-280. 1969

NELSON R.A.- Factors affecting survival of treponema
Pallidum in vitro. Amer. J. Hyg. 48:120. 1948.

NELSON R.A. and MAYER M.N.- Immobilization of trepo
nema pallidum in vitro by antibody produced in syphi
litic infection. J. Exp. Med. 29:369. 1969.

NOGALES M.C. CLAVIJO M.J. y BOROBIO M.V.- Estudio de
5 casos de sífilis congénita. VI Congreso de Micro--
biología de Santiago 1977.

NORRIS S.J. MILLER J. SYKES J.A. and T. FITZGERALD.-
Influence of oxygen tension, sulfhydryl compounds, -
and serum on the Motility and Virulence of T. palli-
dum (Nichols strain) in a cell. Free. System. 22:689
-697. 1978.

O'NEILL P.- A new look at the serology of treponemal
disease. Brit. J. Ven. & Dis. 52:296. 1976.

OVOININNIKOV N.M. and V.V. DELEKTORSK.- Fuster of --

ultrahin sections *Treponema pallidum* under the electromicroscope. Br. J. Vener. Dis 44:1-34. 1968.

OVOININNIKOV N.M. DERNIKOVA L.S.- Vestn. Derm. Vener. 1-141. 1975.

PANGBORN M.C.- A simplified preparation of cardiolipin with a note on purification of leathin for serologic use J. Biol. Chem. 161:71-82. 1945.

PATE J. LLAND E.J. ORDAL.- The fine structure of chondrococcus columnaris II the surface layer of chondrococcus columnaris. J. Cell. Biol. 35:37-50. 1967.

PECHERE J. FRANCESCHINI. COLLART.- Penicillin concentration in the serum lymph nodes and testicles of 31 healthy or syphilitic rabbits given penicillin therapy Lymphocyte transformation reaction in syphilis.

PERSON D.A. SHARP J.I.- Enfermedades reumáticas: Pruebas útiles e indicaciones para su empleo. Consultas 34-21. 1977

PIEDROLA DE ANGULO.- Caracterización de las Inmunoglobulinas IgM e IgG mediante el tratamiento con mer

catoetanol a propósito de un caso de sífilis congénita. Labor. 61:309. 1976.

PILLOT J. and P. DUPONEY.- Composition antigenique, des treponemes IV. Solubilization et purification - des antigens polyxidiques du Treponeme Reiter. Ann. Inst. Pasteur. (Paris) 106:456-468. 1964.

PILLOT J. et REITER.- Structure de spirochetes I. - Etude des geures Treponeme Borrelia et Lectospira - au microscope electronique Ann. Inst. Pasteur 108: - 791-804. 1965.

PILLOT.- Contribution de l'étude du geure Treponeme Structure anatomique et antigenique, Biologie medicale, 4,343. 1966.

PILLOT S. AZABUJA D. et GREAN N.- Etude immuno-chimique du facteur des sujets sans renele pas l'immunofluorescence avec treponeme pallidum. Ann. Immun. Inst. Pasteur. 125:625. 1974.

PINO E. RIVERO J.- IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION directa de los treponemas en lesiones primarias: -- Act. Dermosifográficas: 69:140. 1978.

PORTO E.- Diagnóstico serológico de la sífilis. Medicine 16:1025-1978.

PURITZ E.M. TOMPSON J. DIEBERG Jr. F. KRAUS and YOUNT

W.J.- IgG subclasses of fluorescent treponemal antibody correlation with complement fixation and clinical stage Clin. Imm. Immunopathol. 4:352-361. 1975.

REIMER C.G. BLACK CM.- The specificity of fetal IgM antibody or anti-antibody. Ann. N. Y. Acad. Sci. 254: 77. 1975.

REMMINGTON U.S. MILLER M.J. and BROWNLEE.- IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatr 41:1082. 1968.

REMMINGTON and KLEIM.- Infectious diseases of the fetuses and newborns. Saunders Company-Philadelphia 1976.

RIVERO GAZOL J.- Falsas reacciones biológicas.- Congreso Nacional de Biopatología. Alicante 1974.

RIVERO GAZOL J.- El laboratorio en la inmunología - de la sífilis. Diag. Biol. 25:605. 1976.

RIVERO GAZOL J.- Modificaciones al Test de Nelson.-

Diag. Biol. 26:323. 1977.

RIVERO GAZOL J.- Diagnóstico enzimático de la sífi-

lis. Diag. Biol. 26:505. 1977.

RONALD F. SCHELL J.K. CHAN and JACK L. LE. Frock.-

Endemic Syphilis Passive Transfer of resistance --

with serum and Cell. in Hamsters. J. of Infect. --

Dis 140:378-384. 1979.

ROSE N.R.- The cultivation of treponemes with pre-

servation of characteristic morphology. Am. J. Syph

36-1-1952

ROUQUES L.- La serología de la sífilis. Press. Med.

74:1263-1966.

ROUQUES L.- La serologie de la syphilis. Press Med.

74:1318. 1966.

ROUQUES L.- La serologia de la sífilis. Press. Med.

24:1263. 1967

ROUQUES L.- La serologie de la syphilis.- Press. Med

25:1318. 1967.

RUIZ REQUENA M.R.- Linfocitos T y B en sangre de recién nacidos. Descripción de técnica de microcultivo de linfocitos. Labor. 1:39. 1977.

SAMARRAI H.T. and HENDERSON W.G.- Immunity in syphilis Studies in active immunity Brit. J. Vener. Dis. 52:300-1976.

SCHAUDINN F. HOFFMANN E.- Vorläufiger Bericht Über - das Vorkomen von Spirochäten in siphilitischen Krankheitsprodukten und bei Pallomen. Arch. Gesundh. Amt. 22-527. Berlin 1905.

SCHAUDINN F. HOFFMANN E.- Über Spirochaeta pallida - bei Syphilis und die Unterschiede dieser Form gegenüber anderen Arten dieser Gattung, Berl. Klin. Wschr. 42,673. 1905.

SHELL R. MUSER D.- Effect of macrofage activation on infection with T. Pallidum Infect. Immunit. 12: - 505. 1975.

SCHOFIELD C.B.S.- Sexually Transmitted Disease.- - Churchil Livingstone 1972.

SCHROETER A.I. LUCAS J.B. PRICE E.V. and FALCONE V.H.

Treatment for early syphilis and reactivity of serologic test J. Amer. Med. Ass. 221:471. 1972.

SCOTTI A. LOGAN J.- Fluorescent antibody test for --

neonatal congenital syphilis J. Pediat. 75:1129. 1970

SHERWIN R.H. and ROWLANDS D.T.- Determinants of the

hierarchy of humoral immune responsiveness during ontogeny. J. Immunol. 115:1549-1975.

SEPETJIAN M. MONIER J.C.- Les reactions faussement

positives de la serologie cardio-lipidique et du FTA dans les maladies avec anticorps antinucléaires WHO/VDT/336. 1975.

SOLTANI K. and ARONSON I.K.- Detection by direct immunofluorescence of antibodies to T. pallidum in the

cutaneous infiltrates of rabbit syphiloma J. Infect. Dis. 138-222. 1978.

SOUTH M.A.- Cuando empieza el niño a producir anticuerpos. Cutis (Español) 277-1976.

STIEHM E.R. and AMMAN A.J.- Elevated cord macroglobu

lins in the diagnosis of intraute infection.- New. -
Eng. J. Med. 275:971. 1966.

SWAIN R.H.- Electron microscopic studies of the morphology of pathogenic spirochaetes J. Path. Bact. -
69:117. 1955.

SYKES J.A. and J. KALAN.- Intracellular T. pallidum in cells of Syphilitic lesion of the uterine cervix. Am J. Obste. Genical. 122:361-367. 1975.

SYKES J.A. and J.N. MULLER.- Ultrastrustura studies of treponemes location of axial filaments and some - dimensions of T. pallidum (Nichols strain) T. denti- cola and T. reiteri. Inf. Immunol. 7:100-110. 1973.

THIVOLET J. SEPETJIAN M. MONIER M.J.- False positive reactions to fluorescent treponemal antibody and flo- culation tests in autoimmune diseases: comparative - study WHO/VDT/163. 1969.

TILDEN E.B.- Filtration of T. Pallidum and novyi -- through collodion membranes. J. Bacteriol. 33:307.-- 1937.

TIO B.S.- Comparison between the results of the Bre-

wer rapin plasma reagin card test and other test for syphilis-Brit. J. Vener. Dis. 46/4 287-289-1970.

TISSOT GUERRAZ F. SEPETIJIAN M. MONIER J.C. TRIVOLET J.- Immunofluorescent IgM cuantitation in 279 sera - the newmates. Lab. Hig. Fac. Med. Lyon (pediatrie 29: 8-1974).

TRAMIER M.N. LOTOUSELLE PH. RAUQUE J. TTL.- En syphi lis Bull. Franc. Derm. Syph. 535.540. 1972.

TRAMONT B.C.- Persistencia del treponema Pallidum -- tras terapia con penicilina G.J.A.M.A. en español -- 1022-1024. 1976.

TURNER T.B. and D.H. HOLLANDER.- Cortisone in experi mental syphilis Bull. Johns Hokin. Hosp. 87:503-509 1950.

TURNER T.B. and D.H. HOLLANDER.- Studies on the me-- chanism of action of cortisone in experimental syphi- lis. Am. J. Syph. Gonorrhea Vener. Dis 38:371-387---- 1954.

TURNER T.B. and HOLLANDER D.H.- Biology of the trepo nematosis WHO Monographs Ser. 35 Genova 1957.

WHO/Chronicle 1964 403, 451-1965 19-7, 1969 23-39, -
1976 30-52.

WHO - The Work of WHO 1975 and 1976 n° 347.

WHO - Annual Report of the Director General. Official
Records of the WHO n° 221 58-59. Geneva 1.975.

WHO/TRS/455. Treponematoses Research. Geneva 1970.

WHO/423. Scientific Group on cell-Mediated Immune -
Responses. Report Geneva 1969.

WIEGARD S.E.- Electromicroscopic anatomy of pathogenic
T. Pallidum, J. Inves. Derm. 58-186. 1972.

WILKINSON A.E.- The syphilis healing. Tran. Ophthal.
Soc. U.K. 88:251. 1968.

WILKINSON A.E.- The syphilis healing.- Trans. Oph--
thal. Soc. U.K. 80:130. 1969.

WILKINSON A.E.- Support the presence of IgM antibody
in all patients with early latent syphilis.- WHO/
VDT/347. 1976.

WILKINSON A.E. RODIN P.- IgM FTA test in syphilis -
in adults Its relation to clinical findings.- Brit.
J. Vener. Dis 52:219. 1976.

WILCOX R.R.- Textbook of venereal Diseases and treponematoses. Wilkam Hairneman London 1964.

WILCOX R.R.- The treponemal evolution. Trans. Derm. - Soc. 58:21. 1972.

WILCOX R.R.- Changing patterns of treponemal disease Brit. J. Vener. Dis. 50:169. 1974.

YOBS A.R. BROWN L. and HUNTER E.- Treatment of syphilis Arch. Patho. 77:220. 1964.

YOBS A.R. CLARK J.R. and MOTHERSHED S.E.- Further observation on the persistence of treponema Pallidum after treatment in rabbits and humans. Brit. J. Vener. - Dis. 44:116. 1968

YOKOYAMA M. and YOMAKIDQ.- Direct inmunodifusión technique for IG quantitation Clin. Chim. Acta 23:165. - 1969.

ZEIGLER J.A. and W.P. VAN SELTENE.- Isolation and chemical characterization of outer envelope of Lestospirapionoma Can. J. Microb. 21:1102-1112. 1975.

ZEIGLER J.A. JONES A.M. JONES R.H. and KUBIKA.- Demonstration of extracellular material at the surface of pathogenic Treponema Pallidum Cell. Brit. Vener. Dis. - 1-8. 1976.

